



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TESTİS TORSİYONU İLE OLUŞTURULAN
DOKU HASARINA KARŞI N-ASETİL
SİSTEİN'İN UZUN DÖNEMDE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Akın BODUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2012



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TESTİS TORSİYONU İLE OLUŞTURULAN
DOKU HASARINA KARŞI N-ASETİL
SİSTEİN'İN UZUN DÖNEMDE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Akın BODUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2012

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Akın BODUR'un hazırladığı “ Testis Torsiyonu ile Oluşturulan Doku Hasarına Karşı N-Asetil Sistein'in Uzun Dönemde Etkisinin İncelenmesi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Ahmet ALVER

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Doç. Dr. Ahmet ALVER

Yrd. Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ

Tarih: .../.../201..

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

28.05.2012

AKIN BODUR

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı öncelikle danışman hocam Doç. Dr. Ahmet ALVER olmak üzere bilgilerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Doç. Dr. Birgül VANİZÖR KURAL, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye; histopatolojik değerlendirme aşamasındaki katkılarından dolayı Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Esin YULUĞ'a, lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve tez çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Cemil KAHRAMAN ve Arş. Gör. Diler US'a, ayrıca her konuda yanımda olan ve tez çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım İmran İNCE'ye, Sağlık Bilimleri Enstitüsü alışanlarına, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm arkadaşlarıma ve ömrü hayatım boyunca maddi manevi her konuda bana destek olan aileme teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Akın BODUR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	v
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	viii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Oksidatif Stres Biyokimyasına Genel Bakış ve Oksidatif Stresin İnfertilite ile İlişkisi	5
4.2. Testis Torsiyonu	6
4.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	8
4.4. Tek Taraflı Testis Torsiyonu ve Fertilite	11
4.4.1. Tek Taraflı Torsiyonun Kontralateral Testise Etkisi	12
4.5. Antioksidan Enzimler	13
4.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	14
4.5.2. Katalaz (CAT)	15
4.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	15
4.6. NAC ve Antioksidan Özellikleri	15
4.7. Glutasyon ve Biyolojik Önemi	17
5. GEREÇ ve YÖNTEM	18
5.1. Gereç	18
5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	18
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
5.2. Yöntemler	20
5.2.1. Numunelerin Toplanması	20
5.2.2. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü	20
5.2.3. Protein Tayini	22

	Sayfa
5.2.4. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	24
5.2.5. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivite Tayini	26
5.2.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	26
5.2.7. GSH Ölçümü	29
5.2.8. Histopatolojik Yöntem	30
5.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	31
6. BULGULAR	32
6.1. MDA Seviyesi Ölçüm Sonuçları	32
6.2. SOD Aktivite Ölçüm Sonuçları	34
6.3. CAT Aktivite Ölçüm Sonuçları	36
6.4. GPx Aktivite Ölçüm Sonuçları	38
6.5. GSH Ölçüm Sonuçları	40
6.6. Histopatolojik İnceleme	42
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	55
9. KAYNAKLAR	56
10.ETİK KURUL ONAYI	63
11. ÖZGEÇMİŞ	64

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ**Kısaltmalar**

CAT	Katalaz
FMLP	N-formil metiyonin-lösin-fenilalanin
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
GR	Glutasyon redüktaz
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
NAC	N-Asetil Sistein
NADPH	Nikotin adenin dinükleotit fosfat
NOX 5	NADPH oksidaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TFA	Trifloroasetik asit
XO	Ksantin oksidaz

Formüller

O₂	Oksijen molekülü
O₂⁻	Süperoksit anyonu
OH.	Hidroksil radikali
ROO.	Peroksil radikali
H₂O₂	Hidrojen peroksit

ÖZET

Testis Torsiyonu ile Oluşturulan Doku Hasarına Karşı N-Asetil Sistein'in Uzun Dönemde Etkisinin İncelenmesi

Testis torsiyonu yenidoğanlar, adölesanlar ve çocuklarda görülebilen ürolojik bir vakadır. Testis torsiyonu tedavisinde testislerde kalıcı hasar oluşmasını engellemek amacıyla testisler cerrahi müdahale ile detorsiyone edilmektedir. Bazı çalışmalarda NAC'ın testis torsiyonu ile oluşan iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. İpsilateral ve kontralateral testislerde uzun dönemde oluşan değişimlerin etkileri ele alındığında, bu etkilerin testislerdeki fonksiyon kaybı sonucunda fertilitiyi etkilediği görülmüştür. Bu çalışmada, torsiyonu takiben uygulanan NAC'ın uzun dönemde testisler üzerine etkisinin olup olmadığını antioksidan enzim aktivitelerini ölçerek ve histopatolojik olarak araştırıldı. Çalışmada 18 adet Sprague-Dawley ırkı ratlar üç gruba ayrılarak kullanıldı. Birinci gruba sadece laparotomi yapıldı ve iki ay sonra grubun doku örnekleri alındı. İkinci grupta, sol testis 720° torsiyone edildi, dört saat sonra detorsiyone edildi ve iki ay sonra grubun doku örnekleri alındı. Üçüncü grupta, sol testis 720° torsiyone edildi, dört saat sonra detorsiyone edildi, detorsiyondan 30 dk önce ve takip eden beş gün boyunca 20 mg/kg dozunda NAC uygulandı, reperfüzyondan iki ay sonra grubun doku örnekleri alındı. İki ay sonunda her çıkarılan sol ve sağ testis dokularının MDA, GSH miktarı ve SOD, CAT ve GPx aktivite ölçümleri yapıldı. Alınan doku örneklerinde histopatolojik incelemeler de yapıldı. Sol testisteki MDA konsantrasyonu kontrol grubuna göre iskemi ve NAC gruplarında daha düşük bulundu ($p<0.05$). Sol testisteki iskemi ve NAC gruplarında CAT aktivitelerinde yükseklik gözlemlendi ($p<0.05$). Ayrıca sağ testiste GPx aktivitesi yüksek bulundu ($p<0.05$). Histopatolojik değerlendirmelerde NAC uygulamasının doku hasarının engellenmesinde başarılı olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak testis torsiyonu ile oluşan doku hasarının uzun dönemdeki etkilerini değerlendirmede antioksidan enzim aktivitelerinin tek başına yeterli olmadığına ve NAC uygulamasının da bu aktiviteler üzerinde bir etkisi bulunmadığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan Enzimler, GSH, iskemi-reperfüzyon, MDA, oksidatif stres

SUMMARY

Investigation of Long Term Effects of N-Acetylcysteine Against Tissue Injury Induced by Testicular Torsion

Testicular torsion is a urological emergency which is seen in newborns, children and adolescents. In testicular torsion treatment, surgical detorsion is applied to prevent permanent testicular tissue injury. Some studies showed that NAC has a protective effect against ischemia-reperfusion injury induced by testicular torsion. In the view of the effects of long term alterations on contralateral and ipsilateral testis, the changes in testicular function and eventual reduction fertility. In this study, we investigated whether the NAC treatment following torsion has long term effects on testes by means of antioxidant enzyme activities and histopathological investigation. 18 rats were divided into three groups. First group, the rats were subjected to laparotomy and two months later all testis tissues were collected. Second group, rats left testis was subjected to unilateral torsion (720 degree), four hours later left testis tissue was subjected to detorsion, and then two months later all tissues were collected. Third group, the rats left testis was subjected to unilateral torsion (720 degree), four hours later left testis was subjected to detorsion. To this group, NAC was given 30 minutes before the detorsion and daily for five days following detorsion. Then after reperfusion all tissues were collected. Parts of both left and right testis tissues were used to measure MDA, GSH quantity and they were used to determine SOD, CAT, GPx activity. Rest of the tissues were used for histopathological examination. In left testis tissue, MDA concentration were found to be lower in ischemia and NAC groups when compared to the control group ($p<0.05$). In left testis tissue, CAT activity were observed to be highest in ischemia and NAC groups ($p<0.05$). In addition, in right testis tissue, GPx activity were found high ($p<0.05$). In histopathological evaluation, the administration of NAC prevented the tissue damage.

In conclusion, in evaluation of long term effect of N-Acetylcysteine on tissue injury induced by testicular torsion, antioxidant enzyme activities alone were not sufficient and the administration of NAC was not effective on antioxidant enzymes.

Key Words: Antioxidant enzymes, GSH, ischemia-reperfusion, MDA, oxidative stress

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Testis torsiyonu adölesanlar, yenidoğanlar ve çocuklarda görülebilen, iskemi sonucu infertilite ve subfertiliteye sebep olabilen ürolojik bir vakadır. Torsiyona uğramış testisinde ilk önce venöz dolaşım takip eden süreçte de arteriyel dolaşım bozulur. Kan dolaşımındaki bozulma ile dokuda iskemi gelişir ve iskemik sürecin uzamasına bağlı olarak nekroz oluşur (1). Testislerdeki doku hasarı, temel olarak iskeminin uzamasına bağlı olmasına rağmen, iskemiye takiben oluşan reperfüzyon süresi de önemli rol oynamaktadır. Çünkü iskemik dokunun reperfüzyonu sonucu serbest oksijen türlerinin üretimini arttırdığı belirlenmiştir (2,3).

Testis torsiyonu tedavisinde kalıcı hasarın oluşmaması için testisler cerrahi müdahale ile detorsiyone edilmektedir. Testislerin detorsiyone edilmesi esnasında dokularda reperfüzyon hasarı da oluşmaktadır. Testis torsiyonunun tedavisi ve reperfüzyon hasarının engellenmesi araştırmalarında allopurinol, garlik asit ekstraktı, resveratrol, erdostein ve N-asetil sistein (NAC) gibi maddeler testislerdeki iskemi-reperfüzyon hasarını önleme amaçlı kullanılmıştır (4). NAC tiyol grubu içeren küçük bir moleküldür. 1960'larda mukolitik özellikleriyle tanıtılmıştır. 1960'lardan sonra, serbest radikalleri temizleyen bir ajan ve glutatyonun öncüsü olarak görev yapmasının keşfedilmesinin ardından NAC'ın antioksidan özelliği ortaya konulmuştur (5). Sülfhidril grubu kaynağı olarak NAC, GSH sentezini uyarır, glutatyon-S-transferaz aktivitesini artırır, detoksifikasyonu destekler ve reaktif oksijen türlerine doğrudan etki eder (6).

Tek taraflı torsiyondan sonra ipsilateral (torsiyonun gerçekleştiği testis) ve kontralateral (torsiyona uğramamış, karşı taraf testis) testislerde oluşan değişimlerin uzun dönem sonuçları testis fonksiyonlarını ve sonucunda fertilitiyi etkileyebilir (7). Deneysel torsiyon çalışmalarında, kullanılan deney hayvanları ve türleri, torsiyon derecesi ve torsiyonun süresindeki farklılıklar sonucu, ipsilateral testisteki doku hasarının kontralateral testis fonksiyonları üzerindeki etkileri yönünden farklı sonuçlar ortaya konmuştur. Ancak, immunolojik ve refleks vazokonstriktör mekanizmalarla kontralateral testiste de fonksiyon kaybı olduğu genel olarak kabul görmüştür (8,9).

Bölümümüzde 2006 yılında yapılan akut dönem çalışmanın (10) sonucunda, testis dokusunun reperfüzyonu esnasında NAC'ın lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, MDA seviyelerini düşürdüğü ve testisteki histopatolojik hasarı önlediği belirlenmiştir. Bu çalışmada, 720° ve 4 saat süren torsiyonu takiben uygulanan NAC'ın, uzun dönemde ipsilateral ve kontralateral testisler üzerinde etkisi olup olmadığı oksidatif stres belirteçleri, antioksidan enzim aktiviteleri ölçülerek ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca yaptığımız çalışmada aşağıdaki sorulara cevap aranmaya çalışılmıştır.

1. Uzun dönem testis torsiyonunda NAC, ipsilateral testisteki oksidatif hasarı giderilebilir mi?
2. Antioksidan enzim ölçümleri uzun dönem testis torsiyonundaki hasarı göstermede yeterli midir?
3. Uzun dönem testis torsiyonunda NAC'ın kontralateral testisin korunmasında etkisi var mıdır?

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Oksidatif Stres Biyokimyasına Genel Bakış ve Oksidatif Stresin İnfertilite ile İlişkisi

Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren moleküllerdir. Serbest oksijen radikalleri, hücre metabolizmasının olağan ürünleridir. Vücut enerjisinin büyük kısmı O_2 'nin suya indirgenmesi ile eşleşmiş oksidatif fosforilasyon ile üretir. Bu işlem sırasında, serbest radikaller meydana gelir (11). O_2 formuna bir elektron eklendiğinde $O_2^{\cdot-}$ oluşur, bu anyon reaktif oksijen türleri (ROS)'nin primer şeklidir. $O_2^{\cdot-}$ doğrudan veya dolaylı (metal katalizli ve enzimatik reaksiyonlarla) olarak sekonder ROS'a dönüşebilir. Sekonder ROS'lara örnek olarak OH^{\cdot} , ROO^{\cdot} ve H_2O_2 verilebilir. Serbest radikal ve ROS terimleri genelde birbirinin yerine kullanılır ancak tüm ROS'lar serbest radikal değildir (12). Örneğin, H_2O_2 ROS olmasına rağmen serbest radikal değildir. Çünkü paylaşılmamış elektron içermez.

Azottan türetilmiş serbest radikallerde bulunur. Bunlar nitroz oksit (N_2O), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$), nitroksil anyonu ($NO^{\cdot-}$) ve peroksinitroz asittir (HNO_3). Serbest radikallerin katıldıkları kimyasal reaksiyonlar araştırılmaktadır. Membranlarda lipidlerin, proteinlerde aminoasitlerin ve nükleik asitlerde karbohidratların oksidasyonu bu kimyasal reaksiyonlar arasındadır (13). Başlıca ROS molekülleri ve metabolizmaları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Başlıca ROS molekülleri ve metabolizmaları (Nordberg'den,14)

ROS molekülü	Ana kaynağı	Enzimatik savunma sistemi	Ürün(ler)
Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)	Aktive fagositoz Ksantin oksidaz Flavoenzimler	SOD	$H_2O_2 + O_2$
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Ksantin oksidaz NADPH oksidaz	GPx CAT	$H_2O + GSSG$ $H_2O + O_2$
Hidroksil radikali (OH^{\cdot})	Fe veya Cu tarafından (Fenton reaksiyonu ile)		

ROS üretimi antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aştığında oksidatif stres meydana gelir ve bu da hücre hasarına neden olur. İnsan vücudu ROS hasarından korunmak için birçok antioksidan strateji geliştirmiştir. Bu durum, hücre hasarı olmaksızın normal oksidatif metabolizmanın sürdürülebilmesi için önemlidir. Ancak normal oksidatif metabolizmanın çalışmasında da infeksiyöz patojenlerin yıkımı ve intrasellüler haberleşme gibi ROS-aracılı hücrel cevaplar oluşabilir (11).

Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin testislerdeki koruyucu özelliği ile ilgili olarak sertoli ve germ hücrelerinden üretilen SOD formu olan ekstrasellüler SOD (SOD-Ex)'dan bahsetmek gerekir (15). SOD-Ex sitozolik formundan molekül ağırlığı ve aminoasit bileşimi bakımından ayrılır. SOD-Ex dokuların ekstrasellüler matriksinde lokalize olmuştur. Testisteki SOD-Ex seviyesinin düşük olması serbest radikal indüklü hasara karşı duyarlı olan bu organın, testiküler fonksiyonlarının zarar görmesine neden olur, bu durum da homeostazda kayıpla sonuçlanır (16).

Glutasyon peroksidaz (GPx) ailesi testis, prostat, vas deferens, epididimis ve spermatozoaların tümünde lokalize olmuştur (17). Testiste GPx'in bazı izoformları bulunur. Bu izoformlardan en önemlisi fosfolipid hidroperoksit GPx (PHGPx)'tir. Ayrıca testiste yüksek aktivite gösteren PHGPx Se bağımlı olduğundan, bu enzimin testiküler fonksiyonlara desteği erkek fertilitesi üzerine Se eksikliğinin etkisi ölçülerek de anlaşılabilir (18).

4.2. Testis Torsiyonu

Testis torsiyonu tıp literatüründe ilk kez 1810 yılında tanımlanmış olan genellikle yenidoğanlar, çocuklar ve adölesanlarda görülen acil müdahale gerektiren ürolojik vakadır (19,20). 25 yaş altı erkeklerde görülme sıklığı senede 1/4000'dir. Testis torsiyonu doğumla 77 yaş arasındaki erkeklerde görülmesine rağmen sıklıkla yaşamın ilk yıllarında ve puberte döneminde (tüm torsiyonların %65'i kadar) görülür (19).

Testis torsiyonu ekstravaginal ve intravaginal olmak üzere iki şekilde olur. Yenidoğanlarda daha çok ekstravaginal torsiyon görülürken, çocuklar ve adölesanlarda

ise intravaginal torsiyon görülmektedir. İnavaginal torsiyon tunika vaginalisin distalinde spermatik kordun dönmesiyle oluşur (21). Tunika vaginalisin testisi anterior yüzeyinden kısmen sarması, epididimin posteriora skrotuma tutunması ve epididimin testise yapışık olması testisin hareketliliğini sağlamakla birlikte testisin tunika vaginalis içindeki kısmi stabilizasyonu da sağlanmış olur (21,22). İnavaginal torsiyon genellikle bilateraldir (23). Neonatal dönemde önceden veya yakın zamanlarda inmiş testis ve testisleri kaplayan kısım skrotum içinde hareketlidir. Yenidoğan grubunda kord ve testisleri kaplayan kısım topluca dönebilir. Bu durum ekstravaginal torsiyon olarak ifade edilir. Erken yaşlarda bu tip torsiyon sıklıkla görülmesine rağmen bu yaş grubunda intravaginal torsiyon da görülmektedir (24). Yenidoğanlarda yapılan çalışmada testis torsiyonunun yaklaşık %72'sinin prenatal ve %28'inin postnatal torsiyon olduğu belirlenmiştir (25).

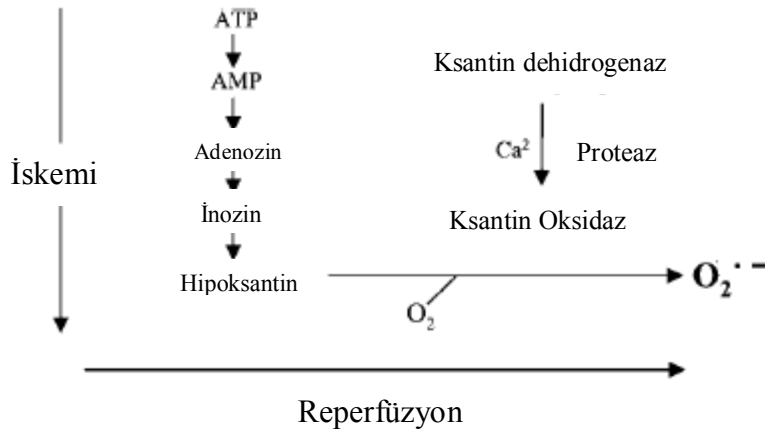
Testis torsiyonunun tedavisinde kalıcı hasar oluşmadan acil testis detorsiyonu ile testisteki kan akımının tekrar sağlanması amaçlanmaktadır (26). Ameliyat ile detorsiyon edilen testiste reperfüzyon sonrası hasarlanma devam etmektedir. Reperfüzyon sonrasında oluşan bu hasardan testiste oluşan iskemik hasara ek olarak reperfüzyon hasarı da sorumlu tutulmaktadır. Testiküler hasarı belirlemede iki faktör önemlidir. Bunlardan ilki, semptomların başlangıç zamanı ile detorsiyon zamanı arasındaki süredir. Diğeri ise kordun dönme derecesidir (27). Testislerdeki hasarlanma temel olarak iskeminin uzamasına bağlı olmasına rağmen reperfüzyon süresi de önemli rol oynamaktadır. Çünkü iskemik dokunun reperfüzyonu serbest oksijen türlerinin üretimini arttırmaktadır (1,3). Yapılan araştırmalar sonucu iki farklı cerrahi prosedür tavsiye edilmektedir: Bu tavsiyelerden biri detorsiyon ve ipsilateral testisi koruma (28), diğeri ise orşiektomi ile kontralateral fonksiyonu ve fertilitiyi korumaktır (29). Yapılan farklı çalışmalarda ise, semptomları 6 saatten kısa olan hastaların çoğunda testis morfolojik açıdan normal tespit edilmiştir fakat bu sürenin uzaması durumunda ise testisteki kalıcı hasarlanmanın arttığı görülmüştür (30).

Testis torsiyonu ve detorsiyonu tipik bir iskemi-reperfüzyon durumu olup ana patolojik olay torsiyona bağlı iskemi-reperfüzyonun neden olduğu reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin yaptığı doku hasarıdır (31). Testisler reaktif oksijen türlerinin yol

açtığı hasara karşı oldukça duyarlıdır (8). Reaktif oksijen türleri geniş kategorideki moleküller radikal (hidroksil anyonu, süperoksit, nitrik oksit, peroksit) ve radikal olmayan (ozon, singlet oksijen, lipid peroksit, hidrojen peroksit) ve oksijen türevleridir (32). Bunlar DNA hasarına, endotelial hasara ve germinal hücre nekrozuna yol açar ki bu biyolojik olaylar subfertiliteye ve infertiliteye sebep olmaktadır (27,33).

4.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi, herhangi dokudaki veya organdaki bir bölgeye besleyen kan akımının yetersiz olduğu durumlarda gelişen ve sonucunda doku zedelenmesine neden olan patolojik bir durumdur (34,35,36). İskemik hasarlanmada oksijen yetersizliği sonucu oksidatif fosforilasyon bozulmaktadır. İskemi esnasında dokudaki ATP seviyesinin azalması sonucu Na^+, K^+ -ATPaz pompası inhibe olur. Böylece hücre içi Na^+ ve Ca^{+2} iyonları artar. Hücre içindeki Ca^{+2} iyon konsantrasyonundaki artış hücredeki iyon dengesini bozar. İyon dengesinin bozulması sonucu Ca^{+2} mitokondri içine sızar. Mitokondrideki Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun artışıyla proteazlar ve fosfolipazlar aktive olduğundan hücre lizise uğrar (37,38). Ksantin oksidaz aracılı serbest radikal hasarının mekanizması Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Ksantin oksidaz aracılı serbest radikal hasarının mekanizması (Mallick'ten, 39)

İskemi sürecinde ATP seviyesi azalmış olsa da ATP kullanımı devam ettiğinden dolayı ATP'den AMP ve adenozin meydana gelmektedir. Adenozin hücre içinden hücre dışına doğru difüze olur ve bu olayın sonucunda hipoksantin ve inozine ayrışır. Hücrelerde artan Ca^{+2} proteazları aktifleştirerek ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümüne neden olur (40). Bu enzim reperfüzyon sırasında oluşan süperoksit anyonunun önemli bir kaynağıdır.

İskemi süresince doku hasarı şiddetli olarak meydana gelir (41). İskemideki yapısal ve metabolik değişiklikler kapiler çapının küçülmesi, endotelial hücrelerin metabolik disfonksiyonu ve enzim sistemlerinin inflammatör aracı üretiminin upregüle olması durumlarını içermektedir. Doku oksijen seviyesinin düşmesi laktat birikimine neden olur ve dokunun pH'sı düşer. Membran transport fonksiyonları zarar görür. Zarar gören fonksiyonlardan en önemlisi intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki artıştır. İkincil mesajcı olarak Ca^{+2} 'un görevi ise bazı enzimleri proinflammatör araçların birikimini tetiklemesidir (36).

İskemi nedeniyle oluşan doku hasarına, ilgili dokuya kan akışının yeniden sağlanmasıyla ek bir şiddetli hasar meydana gelir. Bu şekilde iskemik dokuya yeniden kan akışı sağlanmasına bağlı oluşan doku hasarına neden olan olaya reperfüzyon adı verilir. İskemik dokunun reperfüzyonu dokuda sadece iskemi ile oluşan hasara göre daha ciddi hasara yol açar (36).

Bazı çalışmalarda, bazı organlarda iskemi reperfüzyon hasarının iskemi esnasında başlayan ve reperfüzyon esnasında şiddetlenen farklı geçici olaylar tarafından iki fazlı cevaplarla karakterize edildiği belirlenmiştir. Reperfüze organlarda ROS üretiminin artışı karaciğer ve beyinde oluşan doku hasarından önce görülmektedir. Birinci faz reperfüzyon sonrasında hemen görülen, hücrel hasar açısından tersinir olan tipik oksidatif stres durumudur. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif fosforilasyonun başarısızlığı sonucu mitokondriyal ROS'un üretiminin arttığı bu fazda, ilgili doku hızlı ROS üretiminden türetilen oksidatif stres durumuna antioksidan savunma sistemleri üzerinden karşı koymaktadır. Dokuda indirgenmiş glutatyon miktarı azaldığı zaman, GPx sisteminin savunmanın ilk hattını oluşturduğu görülmektedir (42). İkinci faz

dokunun oksidatif stresten korunmasına bağı olarak saatlere veya günlere yayılır. Bu faz geri dönüşümsüz olarak doku hasarının ve inflamasyonunun görülmesiyle ilişkilidir (43).

Deneysel testiküler iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan geçici doku hasarı sonucunda meydana gelen periyodun 4-6 saatten daha uzun olduğu yönünde bir fikir birliği vardır. Buna rağmen Anderson ve Williamson, insanlarda iskemik periyodun 12 saatten fazla olmasından sonra geçici testiküler hasar meydana gelmesinin göz önünde bulundurulması gerektiğini ve 12 saatten kısa süren tek taraflı testis torsiyonu durumlarında her iki testisin korunmasını tavsiye etmektedirler (31).

Testis torsiyon ile oluşan doku hasarının önlenmesi için deneysel olarak erdostein, NAC, kafeik asit fenetil esteri, L-karnitin gibi birçok antioksidan özellikteki molekül kullanılmıştır. Bu moleküller akut testis torsiyonundaki oksidatif süreci baskılayıp doku hasarının engellenmesinde olumlu sonuçlar göstermişlerdir. Örneğin, kafeik asit fenetil esterinin testisleri, dizosilpine maruz kalınarak oluşan oksidatif stresten koruduğu gösterilmiştir (15). Akut testis torsiyonu araştırmalarında kullanılan bazı antioksidanlar ve gösterdikleri etkiler Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Testis torsiyonu araştırmalarında kullanılan antioksidanlar (Aitken’den,15).

Antioksidan	Sonuç		Antioksidan	Sonuç	
Garlik ekstraktı	MDA	↓	Erdostein	MDA	↓
	XO	↓		GPx	↑
	Histopatolojik	↑			
Kafeik asit	MDA	↓	L-karnitin	MDA	↓
	GPx	↑		Histopatolojik	↑
NAC	MDA	↓	Kafeik asit fenetil esteri	MDA	↓
	GPx	↑		Histopatolojik	↑

4.4. Tek Taraflı Testis Torsiyonu ve Fertilite

Spermatik kordun torsiyonu hatta tek taraflı torsiyon bile uzun zamandır erkek kaynaklı infertilitenin nedenlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Torsiyona uğramış ve kontralateral testislerin her ikisinde oluşan hasarın altında yatan nedenin iskemi ve reperfüzyonla ilişkili oksidatif stres olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Uzun süreli iskemi dönemini takiben yapılan cerrahi müdahale veya kendiliğinden iyileşmenin neticesinde kan akışının sağlanması her iki testiste aktifleşmiş lökositlerin göçüne yol açar ve sonucunda serbest radikallerin üretimi artar. Oksidatif stres daha sonra germinal hücrelerin nekrozuna yol açar ve bu durum subfertilite veya infertiliteye neden olur (8).

Memelilerin testisleri ise oksidatif serbest radikal hasarına karşı oldukça duyarlıdır. Germinal hücreler artan O₂ gerilimine ve radyasyona maruz kaldığında ağır hasara uğrarlar ve ölürlür. Testislerin fonksiyonlarını koruması için sıcaklıklarının fizyolojik sıcaklığın biraz altında olması gerekmektedir (44).

Spermatik kordun torsiyonu ve detorsiyonu sonrası ipsilateral ve kontralateral testislerde iskemi-reperfüzyonun etkileri üzerine yapılan çalışmaların sonuçları tutarsız ve tartışmalıdır. Laboratuvar hayvanlarında yapılan bazı çalışmalarda, torsiyon ve detorsiyonun ipsilateral ve kontralateral testisler üzerine etkisinin olmadığı yönünde sonuçlara varılmıştır. Ancak yapılan diğer çalışmalarda ise doku hasarının göstergesi olan bazı biyokimyasal ve histolojik değişiklikler görülmüştür. Bu çelişkili raporlar cerrahi prosedürlerle ilgili iki farklı tavsiye verilmesine yol açar. Birincisi detorsiyon ve ipsilateral testisin korunması, diğeri ise ipsilateral testisin çıkarılıp kontralateral testisin fonksiyonunu ve fertilitelerini korumaktır. İnsanlarda yapılan çalışma erken (torsiyon zamanının 13 saatten kısa olması) cerrahi müdahale ile detorsiyon yapılarak fertilite korunabilir ancak uzun süreli (torsiyon zamanının ortalama 70 saat olması) torsiyon periyodlarını takiben testisin çıkarılması fertilitayı tehlikeye atar (8). Deney hayvanları üzerine yapılan çalışmalar ile insanlar üzerinde yapılan çalışmalar klinik ve fizyolojik yönden her zaman benzer sonuçlar vermemektedir ve testiküler hasar genellikle ipsilateral ve kontralateral testislerin her ikisinde de meydana gelir (44).

4.4.1. Tek Taraflı Torsiyonun Kontralateral Testise Etkisi

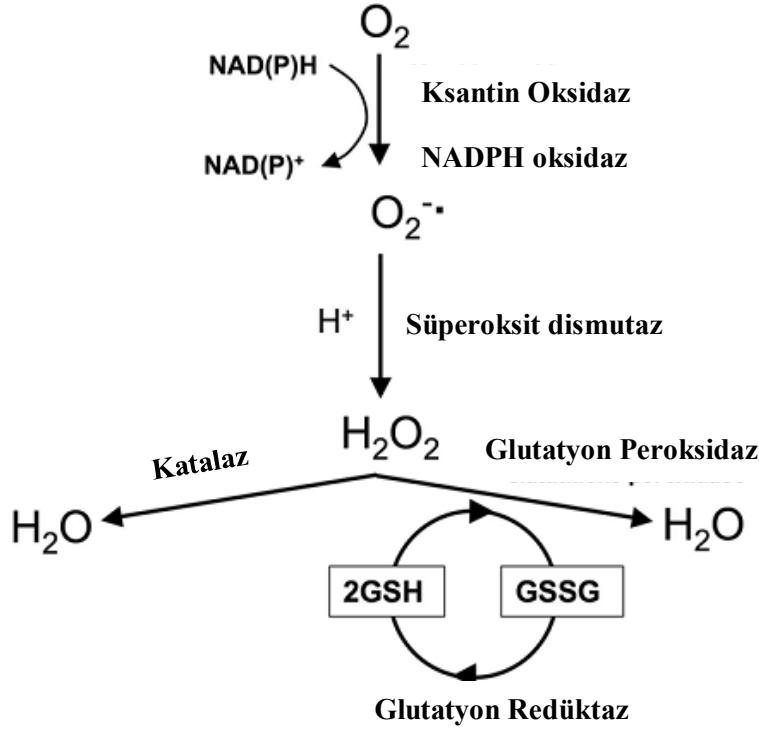
Bazı araştırmacılar kontralateral testisin tek taraflı yapılan torsiyondan etkilenmediğini iddia etmektedir (44). Buna rağmen yapılan farklı çalışmalar bu bakış açısına zıt yönlü bir bakış açısını tercih etmektedir (45,46). Bu tutarsızlıklar farklı hayvan modellerinin kullanılması gibi bazı nedenlerden dolayı testiküler iskemi reperfüzyon hasarını güvenilir şekilde üretmedeki başarısızlık nedeniyle görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, deneysel spermatik kord torsiyonuna maruz bırakılan ratların kontralateral testislerinde DNA'daki değişikliklere ve apoptoza ait biyolojik işaretler görülmüştür (46,47). Bazı çalışmalarda ise nispeten uzamış reperfüzyon zamanlarından sonra ratların kontralateral testislerinde oluşan histolojik hasarı veya sperm miktarında ve hareketliliğindeki azalmayı göstermede başarısızlıklar görülmüştür (22). Saba ve arkadaşları tarafından gösterilen doku hasarının belirteçlerinden olan histolojik değişiklikler, iskemi ve reperfüzyonun zamanına bağlıdır. Biyokimyasal değişiklikler tek taraflı torsiyondan sonra oluşan testiküler hasarını değerlendirilmesi için daha fazla duyarlılık gösterirler (1). Oksidatif stresin biyokimyasal belirteçleri, şiddetli fizyolojik ve morfolojik değişikliklerin meydana gelmesinden önce erken hücresel değişiklikleri göstermektedir. İmmunosupresif ajanlar (rneğin siklosporin) kontralateral testiküler hasarını durdurabilmektedir (48).

Spermatik kord torsiyonundan sonra testislerin her ikisinde kan dolaşımı tekrar başladığından oluşan kontralateral testis hasarını anatomik ve fizyolojik olarak ilginç bir bulmaca gibi görüntü çizmektedir. Tek taraflı testis torsiyonundan anlaşılan durumun afferent uyarıya refleks olarak kontralateral kan akışında azalmayı sağlaması olmalıdır. Buna rağmen dokudaki oksijen konsantrasyonunun lldğ çalışmada kontralateral testisteki O₂ kısmi basıncının tek taraflı torsiyon esnasında etkilenmediği rapor edilmiştir. Spermatik damar ligasyonu kontralateral testise hasar vermemektedir. Spermatik kord torsiyonundan sonra kontralateral testiste oluşan histolojik ve yapısal değişiklikler rapor edilmiştir ancak testiküler arterin ligasyonundan sonra oluşan histolojik ve yapısal değişiklikler rapor edilmemiştir (1).

Spermatik kord torsiyonu ve iskemi-reperfüzyon sürecinde kontralateral testiste oluşan uzun dönem hasarın içerdiği fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Spermatik kord torsiyonundan sonra testisle ilişkili kan dolaşımı açısından bakıldığında böbrek ve karaciğer gibi bazı organlardaki antioksidan seviyelerin değişmemesinden dolayı komşu organların veya sistemik oksidatif durumların testiküler torsiyon tarafından etkilenmediği ileri sürülmüştür (1,45). Ayrıca Akgür ve arkadaşları ipsilateral testisin varlığının kontralateral testisi etkilemediği sonucuna varmışlardır ve bu tür hasardan nöral veya vasküler cevapların çıkarılması gerektiği yönünde öneride bulunmuşlardır (45). Biyokimyasal açıdan bakıldığında kontralateral testis hasarının oksidatif serbest radikaller, Haber-Weiss Fe-katalizli hidroksil radikal üretimi ve hücre hasarının kalsiyum bağımlı yolu tarafından meydana gelen klasik hücre hasarlarından bağımsız olduğu görülmüştür (49).

4.5. Antioksidan Enzimler

Canlı sistemler serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasara karşı hücreleri enzimatik ve non-enzimatik mekanizmalarla korur (11). Enzimatik antioksidanlara SOD, katalaz (CAT), GPx, glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimler örnek olarak verilebilir. Non-enzimatik antioksidanlara ise glutatyon, vitamin E, vitamin C ve albumin gibi bileşikler örnek olarak verilebilir (50). Biyolojik sistemlerde ROS'a karşı geliştirilen antioksidan savunmanın mekanizması Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. ROS üretiminin ve metabolizmasının başlıca yolları (Aitken'den,15)

4.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD (EC 1.15.1.1, EC SOD) enzimi iki süperoksit radikalinin H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümü reaksiyonunu katalizler (51). Organizmada toplam SOD miktarının yaklaşık 3.5 ila 4 g arasında olduğu tahmin edilmektedir (52). SOD enziminin üç tane izoformu vardır. Bu izoformlardan Cu,Zn SOD sitozolde, Mn-SOD mitokondri matriksinde ekstraselüler SOD (SOD-Ex) ise ekstraselüller matrikste bulunur. Cu,Zn SOD'in iki alt grubu, Mn-SOD'un dört alt grubu vardır. SOD-Ex ise tetramerik yapıdadır. Bu izoformlar geçiş metalleri (Cu^{+2} , Mn^{+2}) içerir ve bu geçiş metalleri iki süperoksit molekülü arasında hızlı bir elektron değişimini gerçekleştirmekte rol oynar. H_2O_2 , SOD tarafından oluşturulurken hücreler lipid, protein ve DNA'nın oksidatif hasarını önlemek amacıyla zararlı olan bu molekülü elimine eder. H_2O_2 'nin eliminasyonu katalaz veya glutatyon peroksidaz tarafından sağlanır (15,53).

4.5.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT: EC 1. 11. 1. 6) çeşitli canlı organizmalarında bulunan ve yapısında dört tane hem grubu ihtiva eden bir çeşit hemoproteindir. Bu enzim canlı hücrelerin peroksizomlarında bulunur ve hidrojen peroksidi substrat olarak kullanarak suya dönüşümü reaksiyonunu katalizler (51,54). CAT fenoller ve alkoller gibi farklı substratların detoksifikasyonunda görev yapar. Katalazın antioksidan rolüne örnek olarak Cu^{+2} ve Fe^{+3} tarafından katalizlenen Fenton reaksiyonu tarafından H_2O_2 'den OH. oluşum riskini azaltması verilebilir (14). CAT in vivo şartlarda sık sık peroksidaz aktivitesi sergiler. Memelilerde bu temel olarak karaciğerde, eritrositlerde ve böbreklerde meydana gelir. Kan ve hepatik hücrelerde oksijen dehidrogenazların faaliyetlerinden dolayı üretilen H_2O_2 'yi CAT uzaklaştırır (55). Fizyolojik şartlarda CAT, H_2O_2 konsantrasyonunu kontrol eder. H_2O_2 'nin hücrelerde birikimini engeller ve hücreleri oksidatif tehlikelere karşı korur. H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonlarında CAT ile GPx ortaklaşa hareket eder (56).

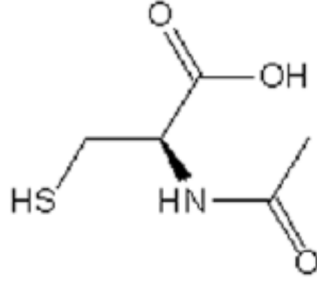
4.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (Glutasyon: H_2O_2 oksidatedüktaz, EC 1.11.1.9) dört alt gruptan oluşan yapısında Se bulunan tetramerik bir enzimdir. Molekül ağırlığı 85 kDa'dur. Bu enzim, H_2O_2 ortamda arttığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatona (GSSG) dönüşümü reaksiyonunu gerçekleştirir ve bunun sonucunda H_2O_2 'yi zararsız bir molekül olan H_2O 'a çevirir. H_2O_2 'i ve organik peroksitleri (örneğin, kümen hidroperoksit) substrat olarak kullanabilir. Sitoplazma ve mitokondride fazla bulunur. Hücreleri solunum zinciri ve diğer metabolik yollardan gelen intraselüler radikallerden ve peroksitlerden korur (51,57,58).

4.6. NAC ve Antioksidan Özellikleri

NAC tiyol grubu içeren, kimyasal formülü $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$ ve molekül ağırlığı 163.2 g/mol olan, doğrudan ve dolaylı olarak antioksidan özellik sergileyen bir bileşiktir.

NAC, redükte glutatyonun (GSH)'ın öncülüdür ve klinik amaçlı 30 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır (6). NAC'ın açık formülü Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. NAC'ın açık formülü (Flora'dan, 59)

NAC'ın serbest tiyol grubu ROS'un elektrofilik gruplarıyla etkileşime girme yeteneğine sahiptir. ROS ile olan bu etkileşim NAC tiyolün ara formuna ve NAC disülfid son ürününün oluşumuna yol açar. Ayrıca NAC, GSH öncülü rolü ile ilişkili olarak antioksidan etki gösterir. GSH glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir. Vücuttaki ajanlara (örneğin hücresel aerobik solunum ve fagositlerin metabolizması) ve dış ajanlara (örneğin kirlilik, sigara dumanı, NO, SO₂) karşı oldukça etkili bir koruyucu rolü vardır. Sisteinin sülfhidril grubu bu ajanları nötralize eder. GSH'm hücre içindeki yeterli seviyesi toksik ajanların zararlı etkilerinden korunmak için zorunludur. GSH sentezi temel olarak karaciğerde ve akciğerlerde gerçekleşir (6,60).

GSH sentezi sitoplazmada iki ayrı enzimatik safhada gerçekleşir. İlk safhada glutamik asit ve sistein γ -glutamilsistein sentetaz enzimi ile birleştirilir. İkinci safhada GSH sentetaz glisini γ -glutamilsistein dipeptidine katarak GSH'ı oluşturur. In vitro olarak, NAC GSH'm öncülü olarak görev yapar. Böylece NAC hücrelere kolaylıkla geçer. GSH sentezi için aminoasitlerin mevcudiyeti sentezin düzenlenmesinde temel faktördür. Glutamik asit ve glisinin hücresel düzeyleri yüksektir ama sisteinin hücresel düzeyi yüksek değildir. Sonuçta, GSH sentezi sisteinin ortamda bulunmasına bağlıdır. Sistein ve L-sistein'in düşük intestinal absorpsyona sahip olması, suda çözünürlüğünün zayıf olması ve hepatik metabolizmasının hızlı olmasından dolayı hücre içi

konsantrasyonu düşüktür. NAC hücre membranından rahatlıkla geçerek sistein kaynağı olarak kullanılır ve glutatyon sentezi artar (60).

4.7. Glutatyon ve Biyolojik Önemi

Glutatyon biyolojik önemi olan intraselüler tiyoldür. GSH'ın serbest radikal süpürücüsü olarak önemli rolü vardır ve hücreleri bazı toksik oksijen türevli kimyasal türlere karşı korur. Glutatyonun hücrelerde indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) formda bulunur. Hücrelerde bulunan glutatyonun neredeyse tamamı GSH formundadır (61).

GSH'ın sabit gereksinimi hücre membran hasarıyla sonuçlanan sülfhidril gruplarının kendiliğinden oksidasyonunun etkilerinden arındırmak için zorunludur. GSH, GPx aktivitesi için önemli bir koenzimdir ve proteinlerin sülfhidril gruplarının oksidasyondan korunmasını sağlar. Bu reaksiyonlar esnasında GSH, GSSG'ye okside olur ve glutatyon redüktaz (GR) tarafından geri dönüştürülür. Bu açıdan bakıldığında lipid hidroperoksit ve H₂O₂ seviyeleri hücrelerde düzenlenir ve GSH protein sentezinin düzenlenmesinde ve bazı enzimlerin esansiyel kofaktörü olarak görev yaparak hücrelerin birçok fonksiyonlarında görev alırlar (62).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve malzemeler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Derin Dondurucu (-80 °C)	Thermo Electron Corporation
Etüv	Gallenkamp
Vorteks	Nüve, NM 110
ELISA pleyti	Bioscience
Santrifüj	Heraeus
Magnetik Karıştırıcı	Ikamag RH
ELISA okuyucusu	VERSA max
Otomatik pipet, 10-100 µL	Socorex
Otomatik pipet, 100-1000 µL	Socorex
Otomatik pipet, 1-5 mL	Eppendorf
pH metre	Hanna Instruments
Saf su cihazı	Aquatron 4 AD
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB 204-S
Deney tüpleri	SH&GLASS
Homojenizatör	Ultra-Turrax T25
Spektrofotometre	Beckman-Coulter
Kuartz Küvet	Agilent Technologies
HPLC saf su cihazı	ELGA, Purelab UHQ
C18 kolon	Fortis Technologies
Soğutmalı santrifüj	Beckman-Coulter
Ekstraksiyon kolonu	Sep-Pak tC18 cartridge
Tam otomatik mikrotom	LEICA RM 2255
Fotomikroskoplu IM	Olympus BX51

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları ve ürün kodları

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma, ürün kodu ve saflığı
Ksantin	Sigma, X-0626
EDTA	Carlo Erbo Reagent, Code No 303227
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma, 97596L5
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Merck, Art 6398
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, Lot#058K0726
Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Merck, Art 1216
Bakır klorür (CuCl_2)	Lancaster, 13167
Ksantin oksidaz	Sigma, Lot#SLBB1574V
Etanol	Sigma, Lot#34870, %99,8
Kloroform	Merck, UN 1888, %99
Triton X-100	Merck, Art 11869
Potasyum klorür (KCl)	Merck, Art 4935
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Merck, Art 563, %85
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma, Lot#S42774-018
1,1,3,3-tetrametoksipropan	Sigma, Lot 76H3424, %99
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck, Art 56, %99,5
Tris-HCl	AppliChem, Lot 5X002338
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, 35050
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, WN 1789, %37
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Sigma, A6011
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck, Art 4871
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na_2HPO_4)	Merck, Art 6576
Trifloroasetik asit	Sigma, Pcode 100982387
Meta-fosforik asit	Merck, K41763746
Asetonitril	Merck, UN 1648, %99,8
NAC	İDOL, Asits Ampul %10

5.2. Yöntemler

5.2.1. Numunelerin Toplanması

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 12.03.2009 tarihinde 2008/22 protokol numaralı onay alındıktan sonra çalışma başlatıldı. Deneyler KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde yapıldı. 18 adet Sprague-Dawley ırkı rat randomize edilerek aşağıda belirtilen üç gruba ayrıldı. Deneyde kullanılan ratlara 12 saatlik açlık süresi sonrası, intramusküler olarak 50 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine verilerek genel anestezi uygulandı.

Grup 1 (n=6); sadece laparotomi yapıp iki ay sonra testis doku örnekleri alındı.

Grup 2 (n=6); laparotomi yapıp sol testis 720 derece torsiyone edildi, dört saat sonra detorsiyone edildi ve iki ay sonra testis doku örnekleri alındı.

Grup 3 (n=6); laparotomi yapıp sol testis 720 derece torsiyone edildi, dört saat sonra detorsiyone edildi, detorsiyondan 30 dakika önce ve takip eden beş gün boyunca intraperitoneal NAC (20 mg/kg) verildi, reperfüzyondan iki ay sonra testis doku örnekleri alındı.

Tüm gruplara laparotomi işlemini takiben beş gün süre ile intramusküler gentamisin uygulandı. İki ay sonunda çıkarılan sağ ve sol testisler biyokimyasal analizleri yapılana kadar -80 °C saklandı. Biyokimyasal analizlerin tümü 3 Kasım 2011 ile 9 Mayıs 2012 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na ait araştırma laboratuvarında yapıldı.

5.2.2. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü

Çıkarılan testislerden elde edilen dokuların yaklaşık 50-100 mg'lık kısmı MDA ölçümü için kullanıldı. MDA ölçümü için kullanılan dokular buz içinde 0.5 mL/L Triton X-100 içeren %1.15'lik KCl çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenizatlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlarda ilgili ölçümler yapıldı.

MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama yöntemine (63) göre yapıldı. Bu metodun esası, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

1- Doku homojenizasyon tamponu: 1.15 g KCl hassas terazide tartıldı ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Oluşan çözeltinin üzerine 0.5 mL Triton X-100 eklendi.

2- %1 'lik H₃PO₄ çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H₃PO₄ alındı ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

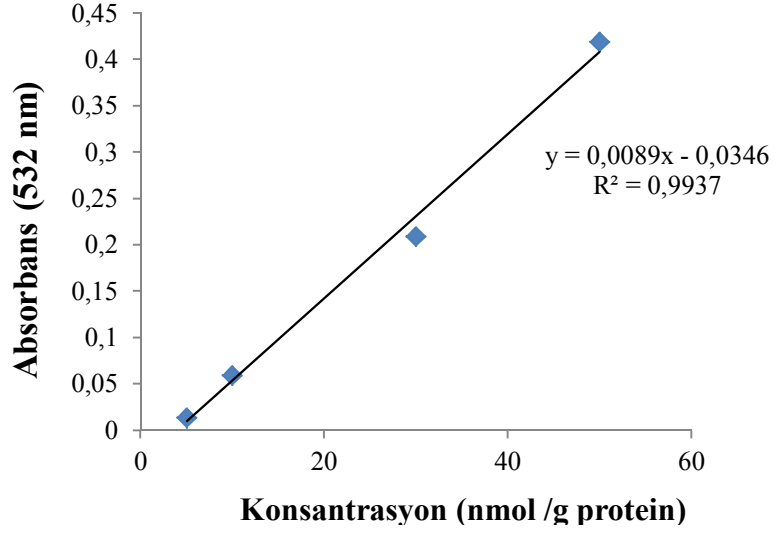
3- Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 0.67 g TBA tartıldı ve 50 mL distile suda magnetik bar yardımıyla 10 dk karıştırıldı. Ardından üzerine 50 mL asetik asit ilave edilerek çözüldü.

4- Standart çözeltiler: 8.3 µL tetrametoksipropan 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu oluşan 10 µmol/mL'lik ara stok çözeltiden dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 5. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Eklene Miktar (mL)
Doku homojenatı	0.5
H ₃ PO ₄	3
Tiyobarbitürik asit	1

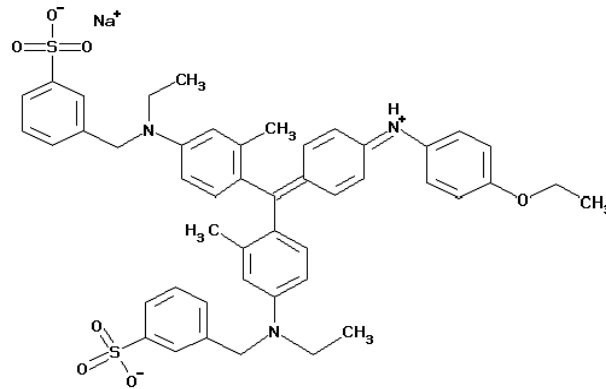
Tablo 5'te verilen karışım vortekslendi. Ardından 100 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar ELISA pleytine pipetlendikten sonra 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Şekil 4'teki standart grafik kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise nmol/g protein olarak hesaplandı. Protein ölçümleri Bradford yöntemiyle yapıldı.



Şekil 4. Doku MDA seviyesi ölçümü için standart grafiği

5.2.3. Protein Tayini

Protein miktarının tayini Bradford yöntemine göre yapıldı. Bu metotta kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası negatif yüklüdür ve proteinlerin üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Kırmızı (λ_{\max} : 465 nm) ve mavi (λ_{\max} : 600 nm) formu vardır. Boyanın proteindeki pozitif yüke bağlanması kırmızı formun mavi forma dönüşmesini sağlar (64). Şekil 5'te Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 5. Coomassie Brilliant Blue G-250 (65)

Kullanılan Çözeltiler:

1- %20'lik HCl çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 27.03 mL %37'lik HCl'den alındı ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. Kullanılan cam malzemelerdeki olabilecek protein kalıntılarını uzaklaştırmak için yıkama çözeltisi olarak kullanıldı.

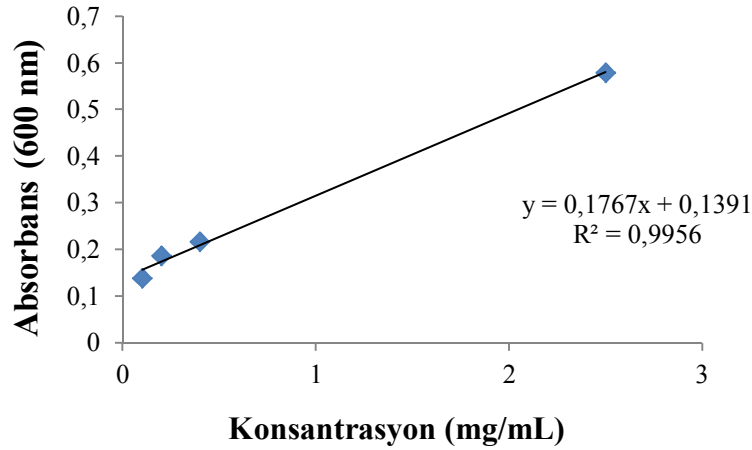
2- Bradford Reaktifi: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 12.5 mL %95'lik etanolde çözüldükten sonra üzerine 25 mL %85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

3- Standart çözeltiler: Standart çözeltiler Bovin Serum Albumin (BSA)'dan hazırlandı. 25 mg BSA bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Oluşan 2.5 mg/mL'lik çözeltiden 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 mg/mL'lik çözeltiler hazırlandı.

Tablo 6. Bradford metodu için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Miktar (µL)
Bradford Reaktifi	100
Homojenat (10 kat seyreltildi)	10

Tablo 6'da verilen reaktiflere karşılık gelen miktarlar ELISA pleytine eklendikten sonra pleyt 10 s karıştırıldı. 600 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Şekil 6'daki standart grafiği kullanılarak protein konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 6. Protein tayininin standart grafiği

Çıkarılan testislerden elde edilen dokuların yaklaşık 50-100 mg'lık diğer kısmı ise antioksidan enzimlerin ve GSH'ın ölçümü için kullanıldı. Dokular buz içinde 0.5 mL/L Triton X-100 içeren pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık Tris-HCl tampon çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar +4°C'de 10 000 g'de 30 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlarda SOD, CAT, GPx aktivite ölçümleri, HPLC'de GSH ölçümü ve Bradford metodu ile protein tayini yapıldı.

5.2.4. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi (66) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin temeli H₂O₂'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

Kullanılan Çözeltiler:

1. Fosfat tamponu (pH=7.0 ; 50 mM): 6.81 g KH₂PO₄ deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. 8.9 g Na₂HPO₄.2H₂O deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7,0 'ye ayarlandı.

2. Hidrojen Peroksit: 240 µL %30'luk H₂O₂'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL 'ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

Doku homojenatları fosfat tamponu ile 3 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Kuartz küvetlere Tablo 7'ye göre pipetlemeler kör ve numune karışımları için ayrı ayrı yapıldı.

Tablo 7. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	0.75	-----
Numune	1.5	1.5
H ₂ O ₂	-----	0.75

H₂O₂ eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm'de 30 s süreyle her 10 s'de bir absorbanslar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Absorbanslardaki düşüşün dakikada 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa numune dilüsyonları yeniden ayarlanmalıdır.

CAT aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 10 s'lik düşüş için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2.3/10) \times \log(A_1/A_2) \text{ s}^{-1} \quad (1)$$

Burada;

A₁= Başlangıç absorbansı

A₂= 10 s sonraki absorbanstır.

Eş. 1'e göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından testis dokularında g protein başına CAT aktivitesi hesaplandı.

5.2.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivite Tayini

GPx aktivite tayininde Enzo Life Science firmasına ait katalog numarası #ADI-900-158 olan spektrofotometrik glutasyon peroksidaz kiti kullanıldı. Enzim aktivitesi 340 nm'de kinetik olarak ölçüldü. Sonuçlar EU/mL cinsinden hesaplandı. Ardından testis dokularında mg protein başına glutasyon peroksidaz aktivitesi EU/g cinsinden hesaplandı. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi Eş. 2'ye göre hesaplandı.

$$\text{GPx} = \frac{\Delta A_{340} / \text{dak.}}{0.00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.19 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}} \times \text{Dilüsyon katsayısı (2)}$$

5.2.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in (67) geliştirdiği yöntemin modifiye edilmesi sonucu yapıldı. Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz ile oluşan süperoksitlerin SOD tarafından kullanılarak, nitroblue tetrazolium (NBT)'dan mor renkli formazan boyası oluşumunun engellenmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar yüksek ise ortamdan o kadar çok O_2^- kaldırılacağı için reaksiyondan sonra oluşan rengin şiddetinde azalma gözlenir. Reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorbansı 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler:

1- 0.3 mM ksantin çözeltisi: 3.65 mg ksantin alındı ve 80 mL deiyonize suda çözüldü.

2- 0.6 mM EDTA çözeltisi: 8.93 mg EDTA alındı ve 40 mL deiyonize suda çözüldü.

3- 150 μM NBT çözeltisi: 4.9 mg NBT alındı ve 40 mL deiyonize suda çözüldü. NBT çözeltisi SOD reaktif karışımına en son eklendi.

4- 400 mM Na₂CO₃ çözeltisi: 1.01 g Na₂CO₃ alındı ve 24 mL deiyonize suda çözüldü.

5- % 0.1'lik Bovin Serum Albumin (BSA) çözeltisi: 12 mg BSA'dan alındı ve 12 mL deiyonize suda çözüldü.

Yukarıdaki beş çözelti karıştırılarak SOD reaksiyon karışımı elde edildi.

6- 2 M Amonyum sülfat çözeltisi: 2.64 g amonyum sülfat 10 mL deiyonize suda çözüldü. Ksantin oksidaz enziminin dilüsyonunda kullanıldı.

7- 0,8 mM CuCl₂ çözeltisi: 5.37 g CuCl₂ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanılır.

8- 167 U/L ksantin oksidaz çözeltisi: 3,3 U/mL'lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL' ye amonyum sülfat çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

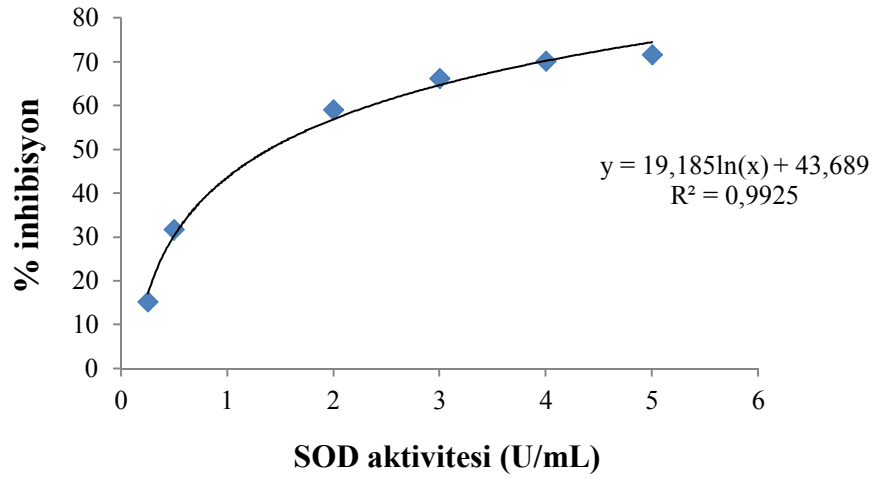
5, 4, 3, 2, 0.5, 0.25 U/mL' lik SOD standartları kullanıldı. SOD standartları pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık Tris-HCl çözeltisi ile dilue edilerek hazırlandı. Standart ve köre etanol/kloroform aşaması uygulanmadı. Numuneler 4 kat dilue edildi. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 8'e göre hazırlandı.

Tablo 8. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı

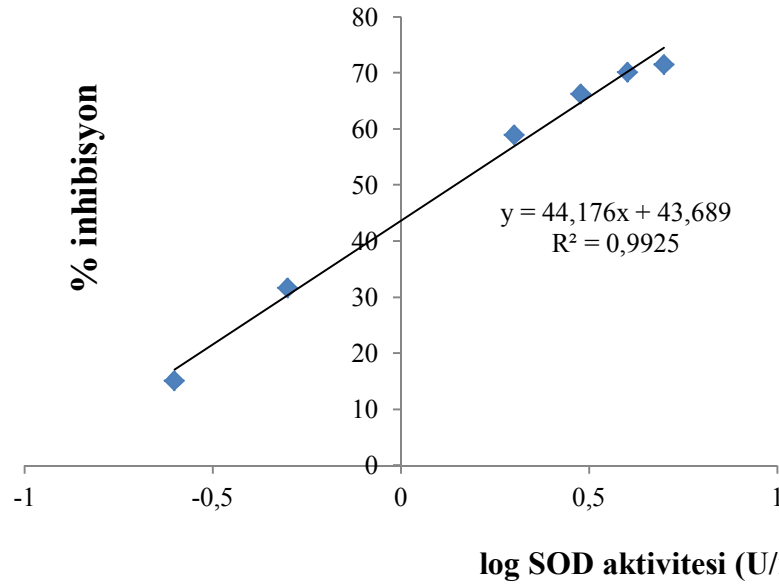
Reaktifler	Miktar (mL)
Standart/Dilue Numune	0.25
SOD reaksiyon karışımı	1.25
Ksantin oksidaz	0.25
25°C'de 20 dakika karanlıkta inkübasyon	
Bakır klorür	0.5
560 nm'de spektrofotometrik ölçüm	

Hesaplamalar Eş. 3'e göre % inhibisyon cinsinden yapıldı ve Şekil 7 ve Şekil 8'deki standart grafikler kullanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{\text{Kör}} - A_{\text{Numune}})}{A_{\text{Kör}}} \times 100 \quad (3)$$



Şekil 7. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği



Şekil 8. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği

5.2.7. GSH Ölçümü

GSH ölçümü, Afzal ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem (68) modifiye edilerek yapıldı. 0.2 mL doku homojenatı alındı, üzerine %3'lük 400 µL metafosforik asit eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 25 dk bekletildi, ardından 10 000 g'de +4°C'de 5 dk santrifüjlendi. Sep-Pak marka C-19 katı faz ekstraksiyon kolonundan 400 µL süpernatant geçirildi (Bu işlemde önce kolon 400 µL metanol ile 2 kere şartlandırıldı). Daha sonra kolon 400 µL %0.1'lik TFA ile elüe edildi. Elüent viallere alınarak HPLC'de çalışıldı. GSH ölçümü için kullanılan HPLC ayarları ve kolon Tablo 9'da gösterilmiştir.

Kullanılan Çözeltiler:

1- % 0.1'lik Trifloroasetik asit çözeltisi: Orjinal şişeden 1000 µL TFA alındı, son hacim HPLC saflığındaki su ile 1 L'ye tamamlandı.

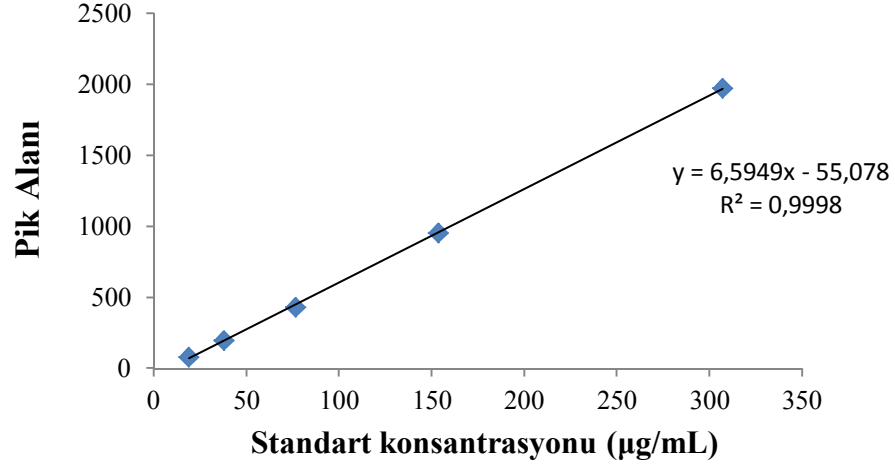
2- Metafosforik asit çözeltisi: 1.5 g metafosforik asit bir miktar HPLC saflığında su ile çözüldü ve son hacim HPLC saflığındaki su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3- Standart Çözeltiler: 15.4 g GSH alındı, 100 mL % 0.1'lik TFA'da çözüldü. 800, 400, 200, 100 µg/mL'lik standartlar seri dilüsyonlarla hazırlandı.

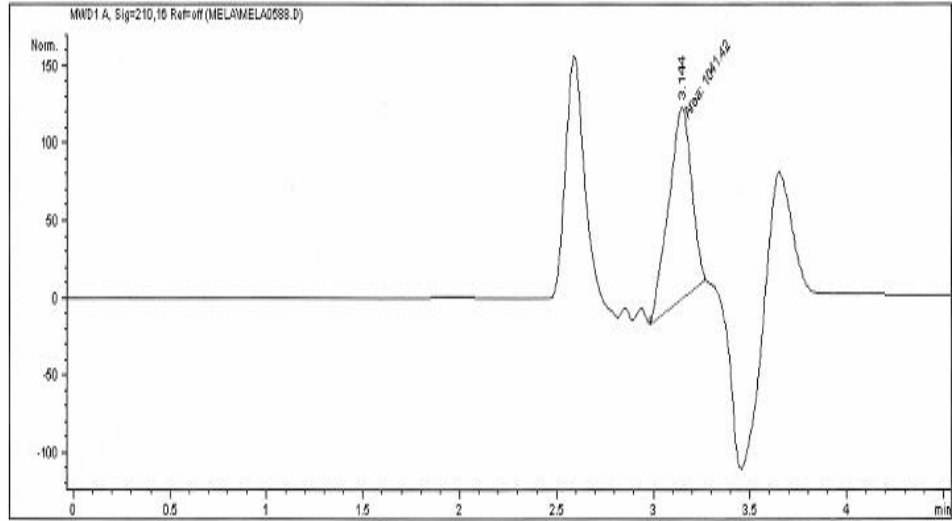
Tablo 9. GSH ölçümü için kullanılan HPLC ayarları ve kolon

Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Mobil faz	%65 Asetonitril, %35 TFA (% 0.1)
Akış Hızı	1 mL/dk
Dedektörün dalga boyu	210 nm
Kolon	C-18 Fortis UniverSil C18 250 x 4.6 mm, 5 µm partikül çaplı

Standart çözeltiler HPLC'de okunarak Şekil 9'daki standart grafik oluşturuldu. Bu grafikten yararlanılarak ölçümler yapıldı. Dokuda GSH ölçümü ile elde edilen kromatogram Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 9. GSH ölçümü için kullanılan standart grafiği



Şekil 10. Dokuda GSH ölçümünde elde edilen HPLC kromatogramı

5.2.8. Histopatolojik Yöntem

Çalışma gruplarına ait testis dokuları ışık mikroskopik inceleme için rutin histolojik doku takibi aşamalarından geçirilerek, parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak, hematoxilen-eozin (H&E) boyama yapıldı. Her bir gruba ait dokular ışık mikroskop altında farklı büyütmelemlerde incelenerek, histopatolojik olarak değerlendirildi.

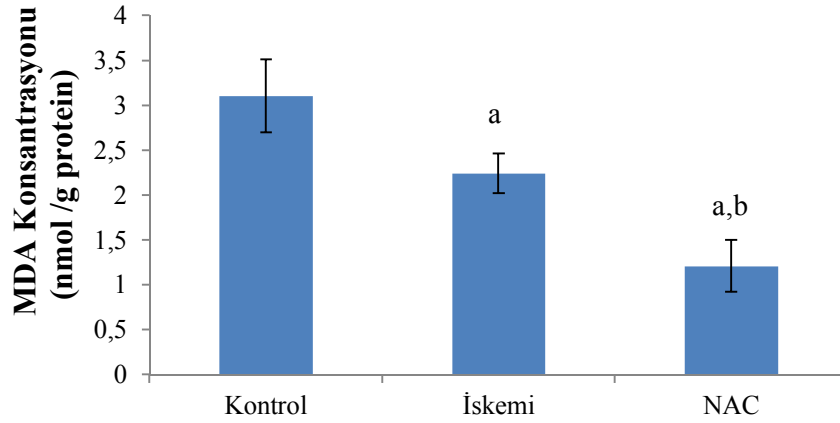
5.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Deney gruplarında ölçülen biyokimyasal parametrelerin ortalama \pm standart sapma ve medyan değerleri hesaplandı. Dağılımın normal olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Grupların karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi yapıldı ve Post-Hoc testi olarak Man-Whitney U testi seçildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. MDA Konsantrasyonu Ölçüm Sonuçları

Sol testis için yapılan doku MDA konsantrasyonlarının ölçümü sonucunda kontrol grubunun ortalama MDA konsantrasyonu 3.11 ± 0.41 nmol/g protein olarak bulundu. Uzun dönem iskemi grubunda ortalama MDA konsantrasyonu 2.24 ± 0.22 nmol/g protein olarak belirlendi. Uzun dönem NAC grubunda ise ortalama MDA konsantrasyonu 1.21 ± 0.29 nmol/g protein olarak bulundu. Sol testislere ait ortalama doku MDA konsantrasyonları ortalamalarının ve istatistiksel olarak anlamlılık derecelerinin gruplara dağılımı Şekil 11’de gösterilmiştir. Ayrıca sol testislerin MDA konsantrasyonlarına ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95’lik güven aralığı Tablo 10’da gösterilmiştir.

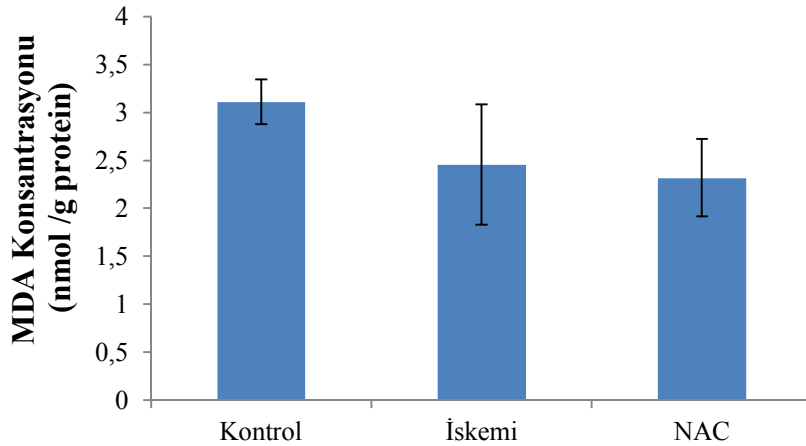


Şekil 11. Sol testislerdeki doku MDA konsantrasyonlarının gruplara göre dağılımı. a:kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde anlamlıdır (iskemi $p=0.016$; NAC $p=0.016$). b:iskemi grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde anlamlıdır (NAC $p=0.016$).

Tablo 10. Sol testislerin MDA konsantrasyonları için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR) ,%95'lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	%95 CI
Kontrol	3.11 \pm 0.41	3.10	0.66	2.60 - 3.61
İskemi	2.24 \pm 0.22	2.29	0.38	1.97 - 2.51
NAC	1.21 \pm 0.29	1.12	0.52	0.75 – 1.67

Sağ testisler için yapılan doku MDA konsantrasyon ölçümü sonucunda kontrol grubunun ortalama MDA düzeyi 3.11 \pm 0.24 nmol/g protein olarak bulundu. Uzun dönem iskemi grubunun ortalama MDA konsantrasyonları 2.46 \pm 0.63 nmol/g protein, uzun dönem NAC grubunun ortalama MDA konsantrasyonları ise 2.32 \pm 0.40 nmol/g protein olarak belirlendi. Sağ testislere ait doku MDA konsantrasyonlarının ortalama değerlerinin gruplara dağılımı Şekil 12'de gösterilmiştir. Ayrıca sağ testislerin MDA konsantrasyonlarına ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95'lik güven aralığı Tablo 11'de gösterilmiştir. Sağ testislere ait gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.



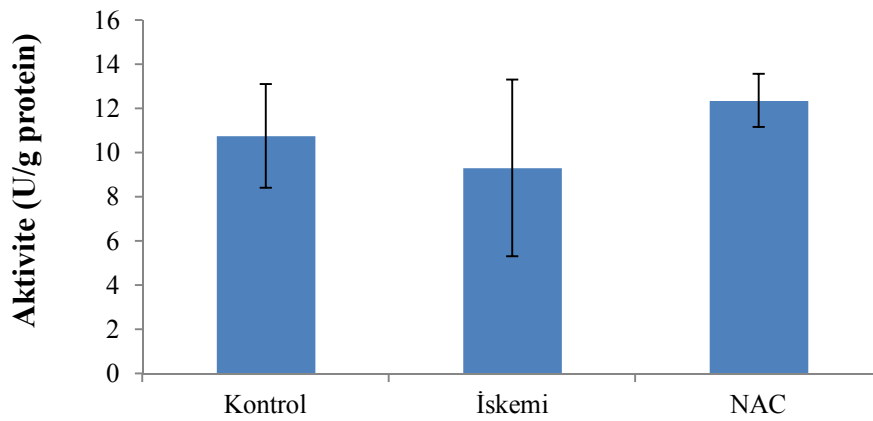
Şekil 12. Sağ testislerdeki doku MDA konsantrasyonlarının gruplara göre dağılımı

Tablo 11. Sağ testislerin MDA konsantrasyonları için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR), %95’lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	%95 CI
Kontrol	3.11 \pm 0.24	3.07	0.37	2.82 - 3.40
İskemi	2.46 \pm 2.32	2.50	1.00	1.68 – 3.24
NAC	0.63 \pm 0.40	2.20	0.73	1.68 – 2.96

6.2. SOD Aktivite Ölçüm Sonuçları

Sol testis dokusunda yapılan SOD aktivite ölçümleri sonucunda kontrol grubunda ortalama SOD aktivitesi 10.76 ± 2.34 U/g protein, uzun dönem iskemi grubunda SOD aktivitesi 9.30 ± 4.01 U/g protein, uzun dönem NAC grubunda SOD aktivitesi ise 12.37 ± 1.21 U/g protein olarak bulundu. Sol testis dokusunda yapılan SOD aktivitesi ölçümlerinin ortalama değerlerinin ve istatistiksel olarak anlamlılık derecelerinin gruplara dağılımı Şekil 13’te gösterilmiştir. Ayrıca sol testislerin SOD aktivitelerine ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95’lik güven aralığı Tablo 12’de gösterilmiştir. Sol testislere ait SOD aktiviteleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.

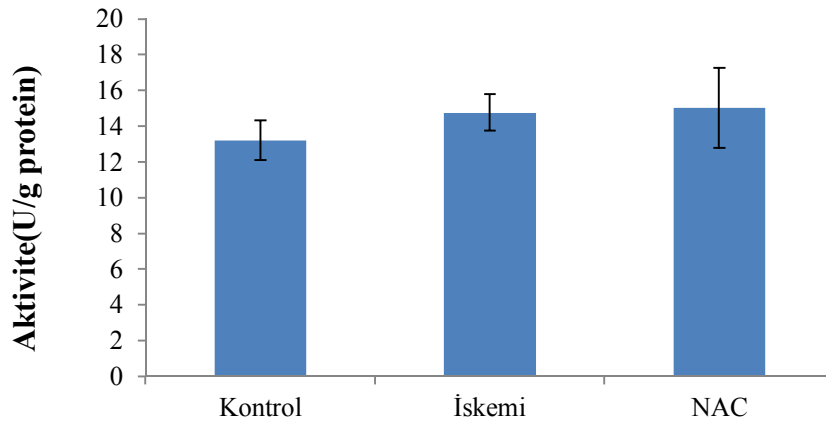


Şekil 13. Sol testislerdeki SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı

Tablo 12. Sol testislerdeki SOD aktiviteleri için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR),%95'lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	%95 CI
Kontrol	10.76 \pm 2.34	11.00	4.30	7.85 – 13.67
İskemi	9.30 \pm 4.01	9.00	7.21	4.33 – 14.27
NAC	12.37 \pm 1.21	12.44	2.32	10.46 – 14.29

Sağ testis dokusunda yapılan SOD aktivite ölçünleri sonucunda kontrol grubunda ortalama SOD aktivitesi 13.22 \pm 1.09 U/g protein, uzun dönem iskemi grubunda ortalama SOD aktivitesi 14.77 \pm 1.02 U/g protein, uzun dönem NAC grubunda ortalama SOD aktivitesi ise 15.04 \pm 2.24 U/g protein olarak bulundu. Sağ testis dokusunda yapılan SOD aktivitesi ölçümlerinin ortalama değerlerinin gruplara dağılımı Şekil 14'te gösterilmiştir. Ayrıca sağ testislerin SOD aktivitelerine ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95'lik güven aralığı Tablo 13'te gösterilmiştir. Sağ testislere ait SOD aktiviteleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.



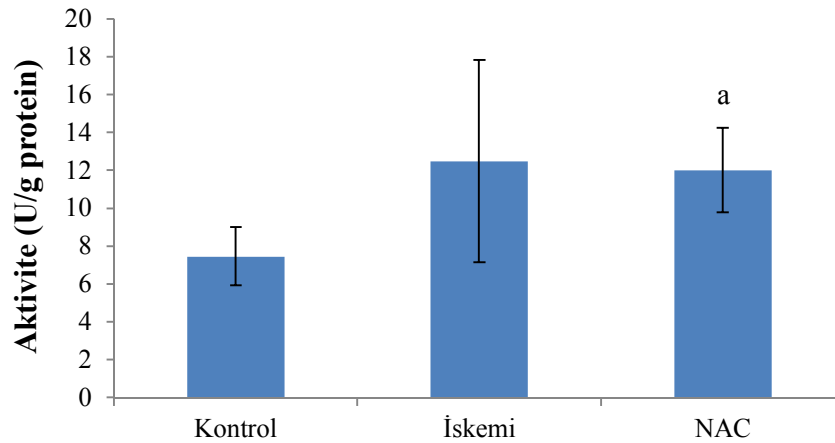
Şekil 14. Sağ testislerdeki SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı

Tablo 13. Sağ testislerdeki SOD aktiviteleri için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR), %95'lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	%95 CI
Kontrol	13.22 \pm 1.09	13.20	1.87	11.86 -14.60
İskemi	14.77 \pm 1.02	14.53	1.59	13.51- 16.04
NAC	15.04 \pm 2.24	14.35	3.87	11.47- 18.60

6.3. CAT Aktivite Ölçüm Sonuçları

Sol testis dokusunda yapılan CAT aktivite ölçümleri sonucunda kontrol grubundaki ortalama CAT aktivitesi 7.46 ± 1.55 U/g protein, uzun dönem iskemi grubundaki ortalama CAT aktivitesi 12.49 ± 5.34 U/g protein, uzun dönem NAC grubundaki CAT aktivitesi ise 12.01 ± 2.23 U/g protein olarak bulundu. Sol testis dokusunda yapılan CAT aktivite ölçümleri sonucu elde edilen ortalama değerlerin ve istatistiksel olarak anlamlılık derecelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 15'te gösterilmiştir. Ayrıca sol testislerin CAT aktivitelerine ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95'lik güven aralığı Tablo 14'te gösterilmiştir.



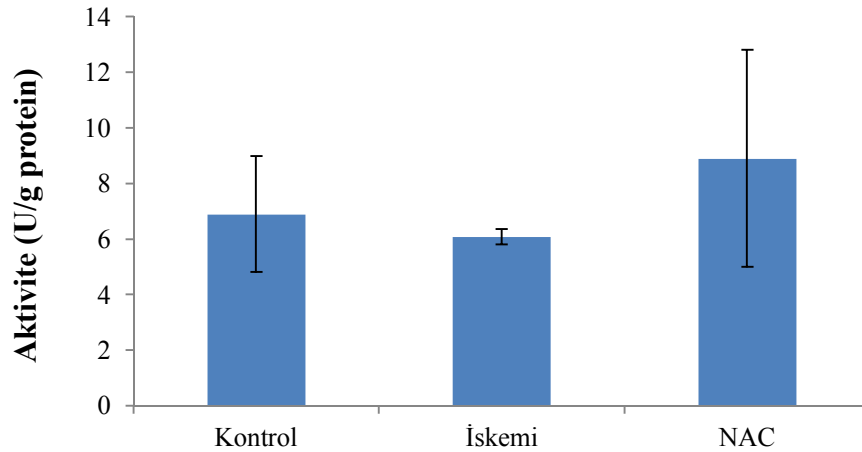
Şekil 15. Sol testislerdeki CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı.

a:kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlıdır (NAC $p = 0.016$).

Tablo 14. Sol testislerdeki CAT aktiviteleri için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR),%95'lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	% 95 CI
Kontrol	7.46 \pm 1.55	7.68	3.00	5.54- 9.39
İskemi	12.49 \pm 5.34	12.00	8.61	5.85-19.11
NAC	12.01 \pm 2.23	11.75	4.14	8.46- 15.56

Sağ testis dokusunda yapılan CAT aktivite ölçümleri sonucunda kontrol grubundaki ortalama CAT aktivitesi 6.89 ± 2.08 U/g protein, uzun dönem iskemi grubundaki ortalama CAT aktivitesi 6.09 ± 0.28 U/g protein, uzun dönem NAC grubundaki ortalama CAT aktivitesi ise 8.90 ± 3.91 U/g protein olarak bulundu. Sağ testis dokusunda yapılan CAT aktivite ölçümlerinin ortalama değerlerinin gruplara göre dağılımı Şekil 16'da gösterilmiştir. Ayrıca sağ testislerin CAT aktivitelerine ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95'lik güven aralığı Tablo 15'te gösterilmiştir. Sağ testislere ait CAT aktiviteleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.



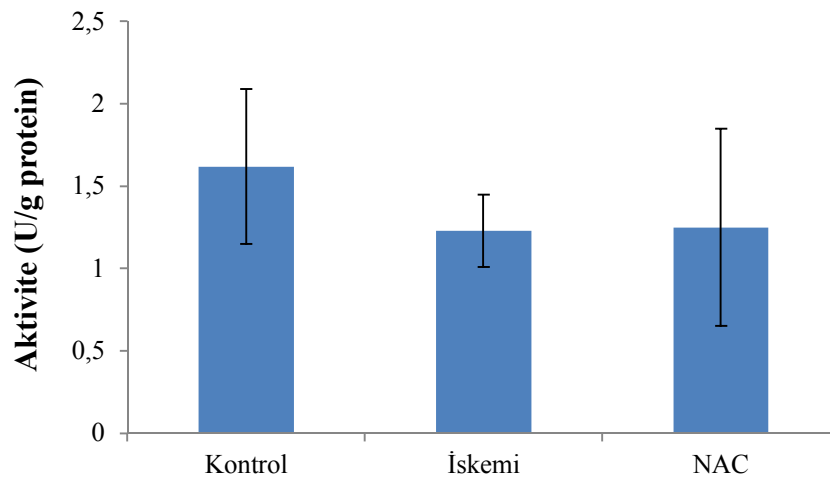
Şekil 16. Sağ testislerdeki CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı

Tablo 15. Sağ testislerdeki CAT aktiviteleri için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR), %95'lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	%95 CI
Kontrol	6.89 \pm 2.08	5.84	3.59	4.32- 9.48
İskemi	6.09 \pm 2.28	5.98	0.49	5.75- 6.44
NAC	8.90 \pm 3.91	8.85	7.04	2.68- 15.12

6.4. GPx Aktivite Ölçüm Sonuçları

Sol testis dokusunda yapılan GPx aktivitesi ölçümleri sonucunda kontrol grubunda ortalama GPx aktivitesi 1.62 ± 0.47 U/g protein, uzun dönem iskemi grubunda ortalama GPx aktivitesi 1.23 ± 0.22 U/g protein, uzun dönem NAC grubunda ortalama GPx aktivitesi 1.24 ± 0.6 U/g protein olarak belirlendi. Sol testis dokusunda yapılan GPx aktivite ölçümlerinin ortalama değerleri Şekil 17'de gösterilmiştir. Ayrıca sol testislerin GPx aktivitelerine ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95'lik güven aralığı Tablo 16'da gösterilmiştir. Sol testislere ait GPx aktiviteleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.

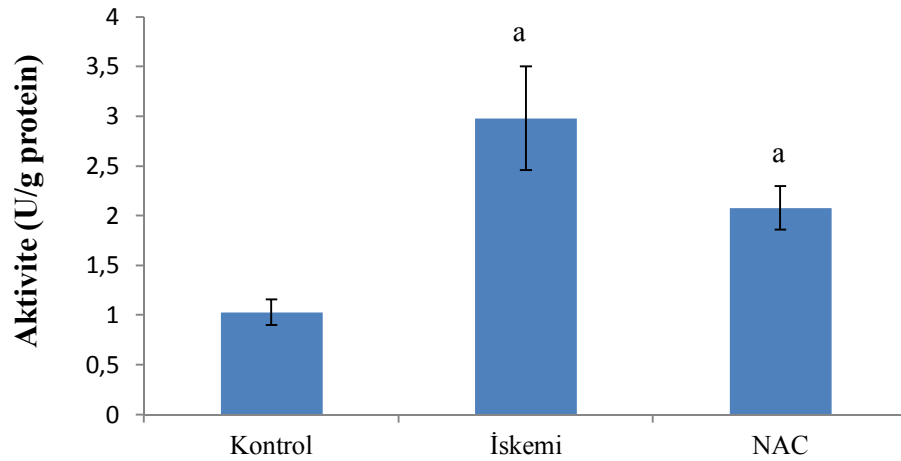


Şekil 17. Sol testislerdeki GPx aktivitesinin gruplara göre dağılımı

Tablo 16. Sol testislerdeki GPx aktiviteleri için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR),%95'lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	%95 CI
Kontrol	1.62 \pm 0.47	1.77	0.90	1.05- 2.20
İskemi	1.23 \pm 0.22	1.26	0.42	0.95- 1.50
NAC	1.24 \pm 0.60	0.99	0.99	0.29- 2.20

Sağ testis dokusunda yapılan GPx aktivitesi ölçümleri sonucunda kontrol grubunda ortalama GPx aktivitesi 1.03 \pm 0.13 U/g protein, uzun dönem iskemi grubunda ortalama GPx aktivitesi 2.98 \pm 0.52 U/g protein, uzun dönem NAC grubunda ortalama GPx aktivitesi 2.08 \pm 0.22 U/g protein olarak belirlendi. Sağ testis dokusunda yapılan GPx aktivite ölçümlerinin ortalama değerlerinin ve istatistiksel olarak anlamlılık derecelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 18'de gösterilmiştir. Ayrıca sağ testislerin GPx aktivitelerine ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95'lik güven aralığı Tablo 17'de gösterilmiştir.



Şekil 18. Sağ testislerdeki GPx aktivitesinin gruplara göre dağılımı.

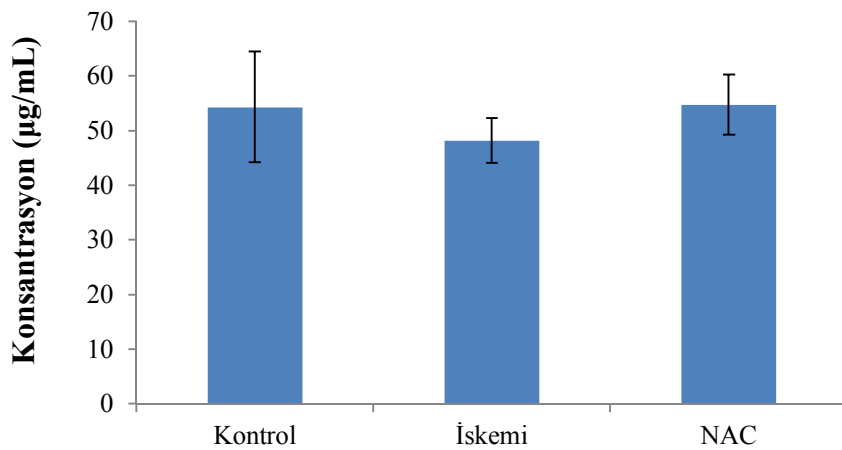
a: kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (iskemi $p = 0,008$, NAC $p = 0,016$).

Tablo 17. Sağ testislerdeki GPx aktiviteleri için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR),%95'lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	%95 CI
Kontrol	1.03 \pm 0.13	1.05	0.26	0.86- 1.20
İskemi	2.98 \pm 0.52	3.20	1.00	2.33- 3.62
NAC	2.08 \pm 0.22	2.06	0.40	1.74- 2.42

6.5. GSH Ölçüm Sonuçları

Sol testis dokusunda yapılan ölçümler sonucunda kontrol grubunda ortalama GSH seviyesi $54.36 \pm 10.15 \mu\text{g/mL}$, uzun dönem iskemi grubunda ortalama GSH seviyesi $48.24 \pm 4.09 \mu\text{g/mL}$, uzun dönem NAC grubunda ise ortalama GSH seviyesi $54.78 \pm 5.54 \mu\text{g/mL}$ olarak bulundu. Sol testis dokusunda yapılan GSH değerlerinin ortalamalarının gruplara göre dağılımı Şekil 19'da gösterilmiştir. Ayrıca sol testislerin GSH değerlerine ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95'lik güven aralığı Tablo 18'de gösterilmiştir. Sol testislere ait GSH değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.

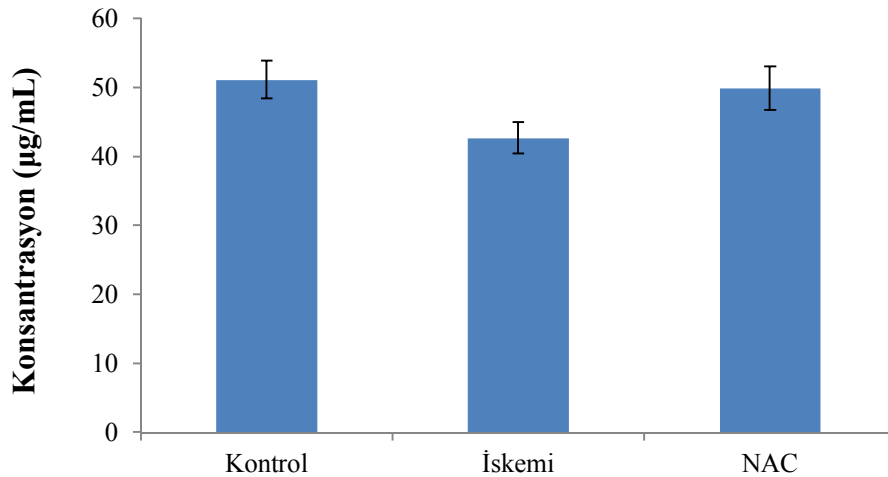


Şekil 19. Sol testislerdeki GSH değerlerinin gruplara göre dağılımı

Tablo 18. Sol testislerdeki GSH değerleri için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR), %95'lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	%95 CI
Kontrol	54.36 \pm 10.15	55.90	17.05	41.76- 66.96
İskemi	48.24 \pm 4.09	48.00	6.40	43.16- 53.22
NAC	54.78 \pm 5.54	56.55	9.98	45.95- 63.60

Sağ testis dokusunda yapılan ölçümler sonucunda kontrol grubunda ortalama GSH seviyesi 51.13 ± 6.21 $\mu\text{g/mL}$, uzun dönem iskemi grubunda ortalama GSH seviyesi 42.70 ± 2.75 $\mu\text{g/mL}$, uzun dönem NAC grubunda ise ortalama GSH seviyesi 49.90 ± 3.20 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu. Sağ testis dokularında bulunan GSH değerlerinin ortalamalarının gruplara göre dağılımı grafiksel olarak Şekil 20'de gösterilmiştir. Ayrıca sol testislerin GSH değerlerine ait ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range ve %95'lik güven aralığı Tablo 19'da gösterilmiştir. Sağ testislere ait GSH değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.



Şekil 20. Sağ testislerdeki GSH değerlerinin gruplara göre dağılımı.

Tablo 19. Sağ testislerdeki GSH değerleri için ortalama \pm standart sapma (SD), medyan, interquartile range (IQR),%95'lik güven aralığı (%95 CI) değerleri

	Ortalama \pm SD	Medyan	IQR	%95 CI
Kontrol	51.13 \pm 6.21	52.43	12.10	43.42- 58.82
İskemi	42.70 \pm 2.75	41.10	4.70	39.29- 46.11
NAC	49.90 \pm 3.20	51.40	5.22	44.87- 55.08

6.6 Histopatolojik İnceleme

Torsiyon/Detorsiyon ve NAC uygulanan Torsiyon/Detorsiyon gruplarına ait sağ ve sol testisler aşağıda gösterilmiştir (Resim 1, Resim 2).

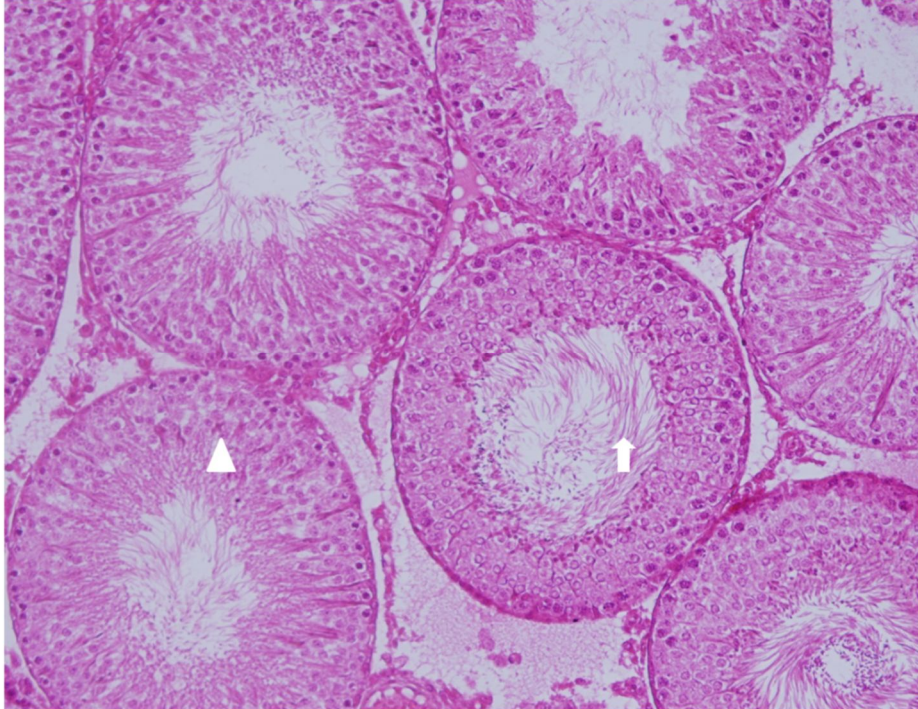


Resim 1. Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sağ ve sol testisler



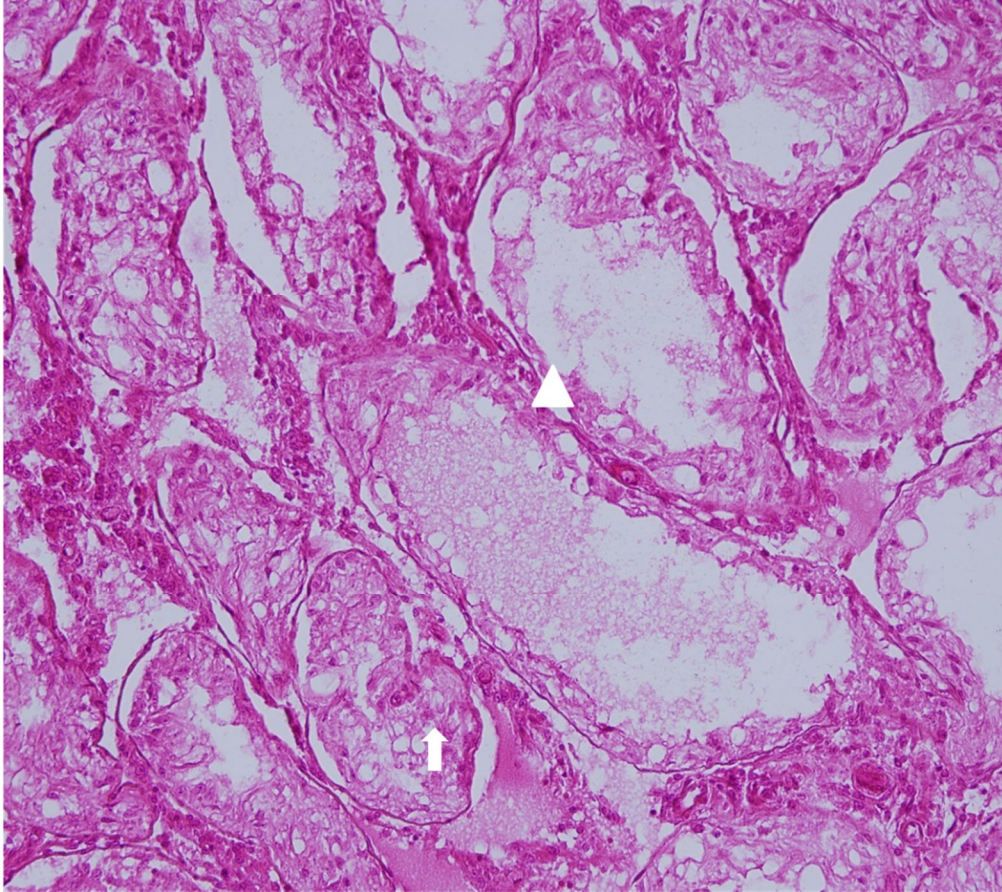
Resim 2. NAC uygulanan Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sağ ve sol testisler

Testis dokularının ışık mikroskopik değerlendirilmesinde, kontrol grubuna ait sol testisin normal testis morfolojisi gösterilmektedir (Resim 3).



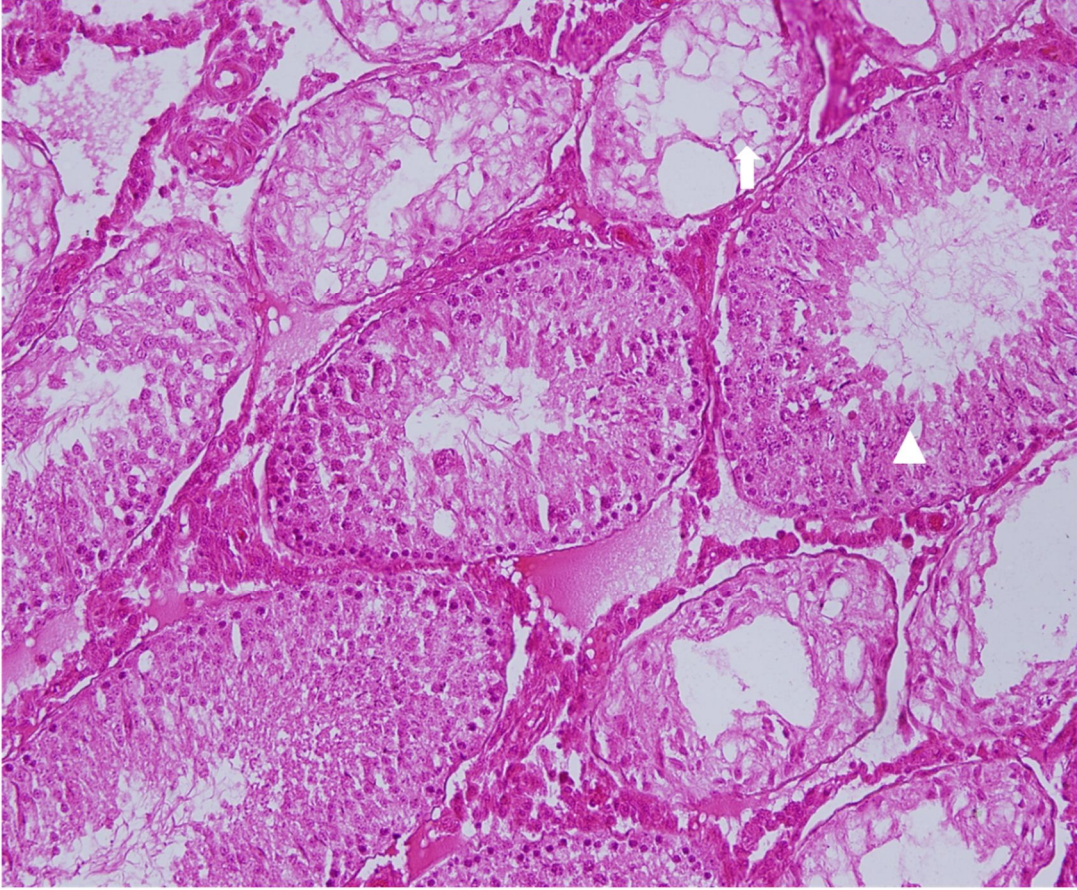
Resim 3. Kontrol grubuna ait sol testiste, normal seminifer tubul epitel yapısı (▲) ve spermatozoonlar (↑) izlendi. (H&E X 200)

Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sol testis preparatlarının değerlendirmesinde seminifer tubullerin germinal epitel tabakasının dejeneratif değişiklikler gösterdiği, spermatogenetik hücrelerin oldukça azaldığı, lümende spermatozoonların olmadığı, interstisyel alanda vazokonjesyonun olduğu izlendi (Resim 4).



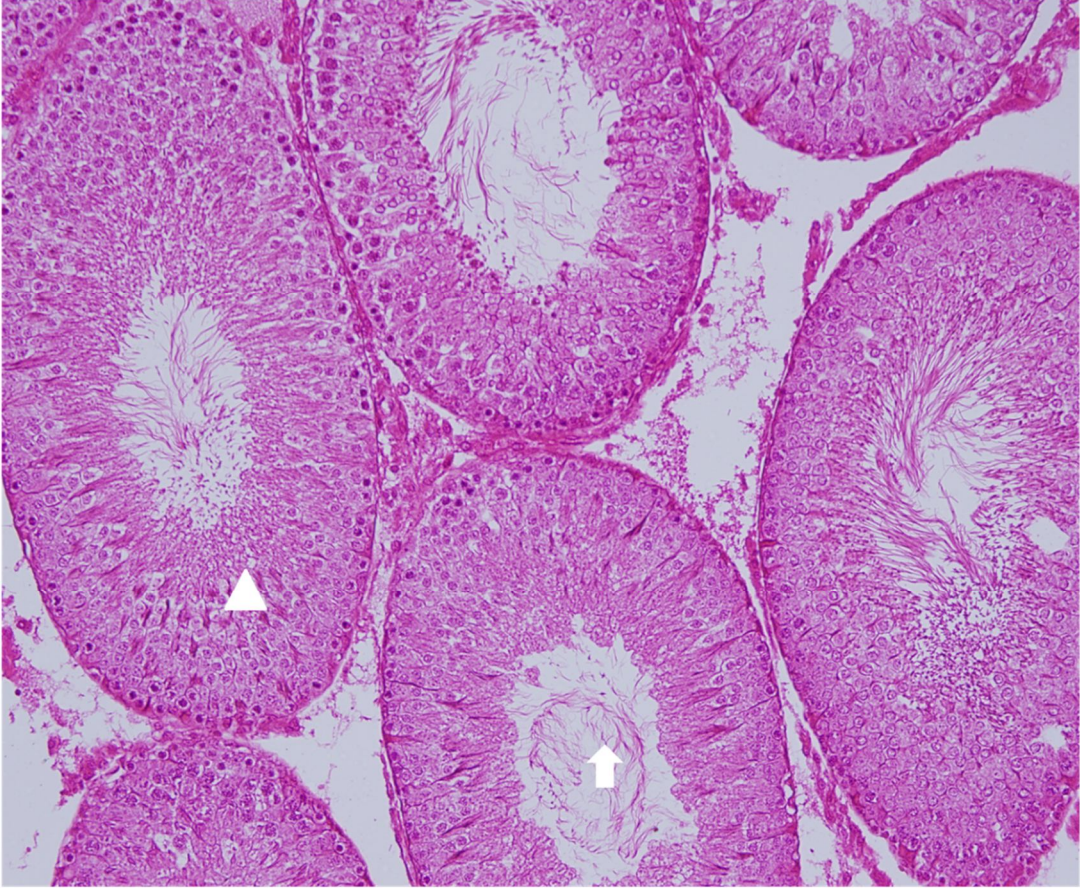
Resim 4. Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sol testiste, seminifer tubul germinal epiteli tamamen dökülmüş (▲), lümende düzensiz dizilmiş germinal hücreler (↑) izlendi. (H&E X 200)

NAC uygulanan Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sol testis preparatlarında dejeneratif seminifer tubul germinal epitel gösteren tubullerin yanında germinal epiteli düzenli, lümende germinal epitel hücreleri içeren tubullere rastlandı. İnterstisiyel alanda vazokonjesyon azalmıştı (Resim 5).



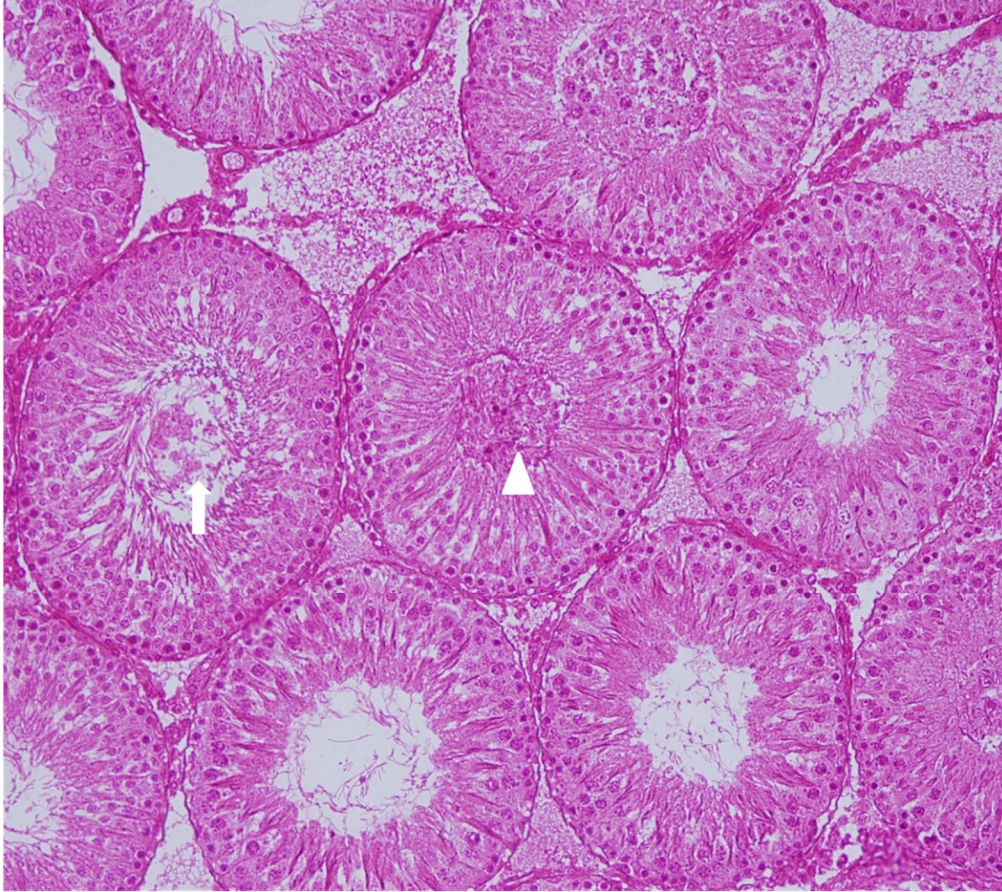
Resim 5. NAC uygulanan uzun dönem Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sol testiste, lümende yer yer spermatozoonlar izlenen düzenli germinal epitel yapısı (▲) içeren tubuller yanında germinal epitel tabakası düzensiz (↑) olan tubuller bir arada izlendi. (H&E X 200)

Kontrol grubuna ait sađ testis deđerlendirmesinde normal testis morfolojisi izlendi. Seminifer tubullerin germinel epiteli dűzgűn dizilimli idi. Lűmende spermatozoonlar izlendi (Resim 6).



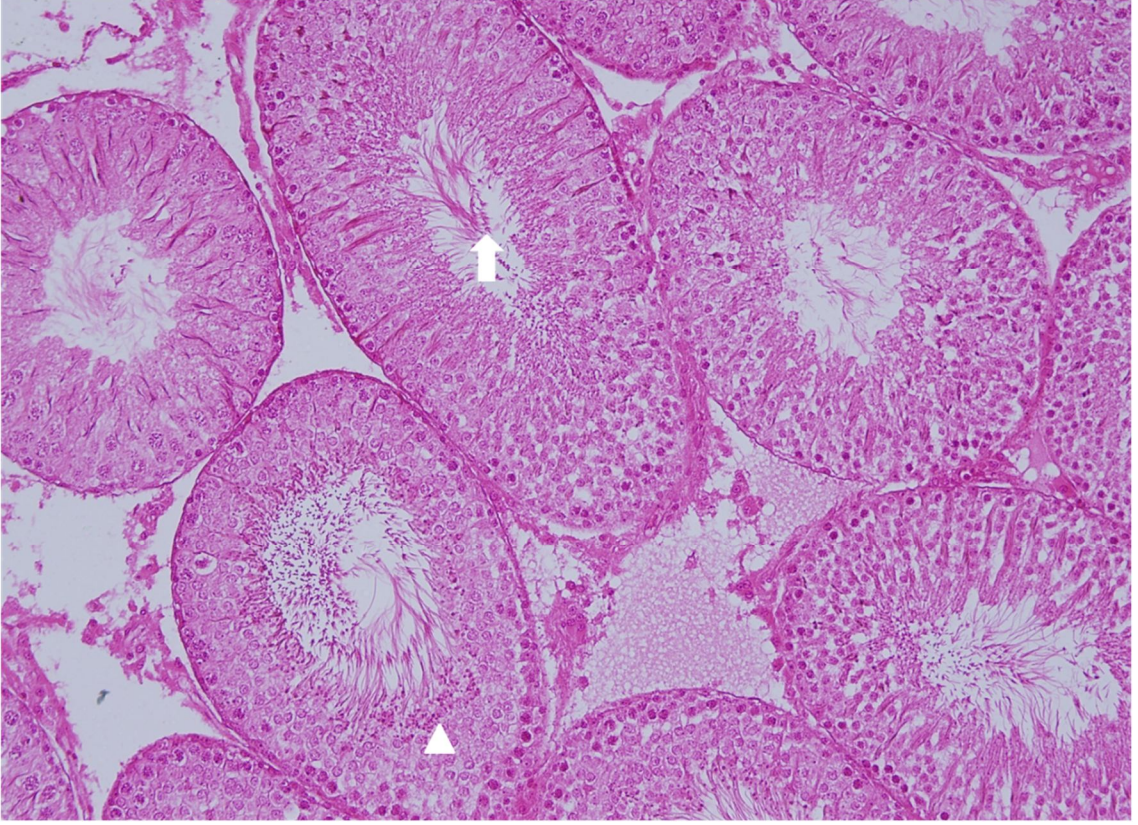
Resim 6. Kontrol grubuna ait sađ testiste, lűmende germinel epitel hűcreleri (▲) ve spermatozoonlar (↑) olan dűzenli seminifer tubul yapısı izlendi. (H&E X 200)

Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sağ testis preparatlarının değerlendirmesinde, seminifer tubullerde germinal epitelin lümenine doğru kümelene gösterdiği ve bazı seminifer tubullerde lümeninde spermatozoonların azalmış olduğu izlendi. (Resim 7).



Resim 7. Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sağ testiste yer yer germinal epitel hücrelerinin seminifer tubul lümenine doğru kümelene gösterdiği tubul yapısı izlendi. (H&E X 200)

NAC uygulanan Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sağ testis preparatları normal testis seminifer tubul ve interstisyel alan morfolojisi (Resim 8).



Resim 8. NAC uygulanan Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sağ testiste normal seminifer tubul (▲) ve lümende spermatozoonlar (↑) mevcuttur. (H&E X 200)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Testis torsiyonu acil tıbbi girişim gerektiren vasküler bir olaydır (8). Torsiyonun derecesi ve süresini bağılı olarak ipsilateral testiste fonksiyon kaybı ve buna bağılı olarak subfertilite veya ciddi vakalarda tetisin kaybı gerçekleşmektedir (9). Ayrıca, tek taraflı testis torsiyonunda, kontralateral testiste de fonksiyon kaybı ve doku hasarı gözlenmektedir. Temel patolojik mekanizmalar tam olarak ortaya konulamamış olmasına rağmen, testis torsiyonundaki doku hasarında iskemi ve reperfüzyon sürecinde şekillenen ROS'un önemli rol oynadığı bilinmektedir (7,9). Spermatik kordun kendi etrafında burkulması sonucu, dokuyu besleyen testiküler arterde kan akımı azalır ve bölgede şişme, kızarıklık, ağrı, dejenerasyon ve nekroz gibi iskemik değişiklikler gerçekleşir (3,7). İskeminin şiddeti torsiyonun derecesiyle orantılıdır. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, 720° torsiyonun ipsilateral testiste kan akımını tamamen durdurduğu ve torsiyonun 4 saati geçtikten sonra dokunun nekroze olduğu ve geri dönüşümün mümkün olmadığı gösterilmiştir (7). Ancak hipotermiye maruz kalan ratlarda uzun dönem testiküler doku hasarında azalma gözleendiği de bildirilmiştir (69). İskemiye uğramış testis dokusunda, dokuya gelen oksijen miktarındaki azalmaya bağılı olarak ATP üretiminde azalma vardır. Hücre içi iyon dengesini sağlayan ATP bağımlı membran pompalarındaki yetersizlik sonucu iyon dengesi bozulur ve hücre içine Ca^{+2} konsantrasyonu artar ve bu sürecin sonunda ksantin dehidrogenaz enzimi süperoksit üreten bir enzim olan ksantin oksidaza dönüşür (39). Ayrıca, iskemi komplement sistemi aktifleştirir ve kemoatraktan bileşiklerin salgılanmasını uyarır. Bölgeye yine süperoksit üreten polimorf nükleer lökositlerin göçü gerçekleşir (3). Ancak testis torsiyonundaki asıl doku hasarı reperfüzyonu takip eden süreçte gerçekleşir. Bölgenin yeniden kanlanmasına bağılı olarak, XO ve mitokondriyal elektron tranport zinciri tarafından süperoksit üretimi artar. Süperoksitin yıkıcı etkisinin yanı sıra, iskemi sonucu artan mikrovasküler permeabilite artışı ve bozulmuş vazoregülasyonda hasarın büyümesinde önemli rol oynar. Hasarın büyüklüğüne göre paraşimal hücre disfonksiyonu ve nekroz gelişir (7,39). Diğer dokularda olduğu gibi testis dokusunda da bulunan antioksidan savunma sistemi oluşan hasara karşı dokuyu korumaya çalışır. Deneysel torsiyon çalışmasında, birçok antioksidan özellikli bileşik antioksidan savunmayı güçlendirmek için kullanılmıştır (15).

NAC tiyol grubu içeren küçük bir moleküldür. Hücre membranlarından kolaylıkla geçer ve toksitesi düşüktür. Genel olarak asetaminofen zehirlenmesinde kullanılan antidot olarak bilinir. Mukolitik bir ilaç olarak 1960'lı yıllarda piyasaya çıkmıştır. Sonraki yıllarda antioksidan özelliği keşfedilen NAC serbest radikalleri temizleyici ve glutasyon öncülü olarak, oksidatif bileşiklere karşı önemli bir savunma sistemi oluşturur (60,70). Bu özelliklerinden dolayı birçok iskemi-reperfüzyon çalışmalarında kullanılmıştır (4,10,71). Bölümümüzde 2006 yılında yapılan çalışmada, akut testiküler torsiyonda NAC'ın lipid peroksidasyonunu azalttığı, antioksidan savunma sistemini glutasyon peroksidaz aktivitesini artırarak güçlendirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, reperfüzyon öncesi NAC uygulamasının SOD ve CAT aktivitelerinde önemli bir değişiklik yapmazken, GPx aktivitesini anlamlı derecede yükselttiği ve MDA seviyelerini de reperfüzyon grubuna göre düşürdüğü bulunmuştur (10).

DeneySEL testis torsiyonunda kullanılan antioksidan özellikli bileşiklerin uzun dönem etkilerini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan bu çalışmaların hiç birinde antioksidan enzimler ölçülmemiş, doku hasarı çoğunlukla histopatolojik olarak ve MDA ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir. Abraham ve arkadaşlarının yaptığı uzun dönem çalışmada allopurinol, asetilsalisilik asit, askorbik asit ve kuersetin gibi bileşiklerin etkinliği farklı hayvan türlerinde, farklı torsiyon derecelerinde ve sürelerinde incelenmiştir (72). Turner ve arkadaşları ratlarda yaptıkları iki aylık bir çalışmada, allopurinolün 720° lik torsiyonu takiben bir saatlik iskemik hasarı önlemede başarısız olduğunu bildirmişlerdir (73). Ancak, Abraham ve arkadaşlarının tavşanlarda farklı bileşiklerin etkinliklerini belirlemek amacıyla yaptıkları iki aylık bir çalışmada, sadece allopurinolün klempt kullanılarak oluşturulan bir saatlik iskemi hasarını önlemede başarılı olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmacıların deneklere intravenöz uyguladıkları SOD'a karşı elde ettikleri sonuçlarda birbirinden farklıdır (72). Bu farklılıkların altında kullanılan hayvan türlerini farklılığı kadar torsiyon derecesi ve süresinin de farklılığı vardır. Turner ve arkadaşları yaptıkları kapsamlı bir çalışmada, torsiyon derecesi ve süresinin testis dokusuna olan etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, özellikle 720° lik torsiyonda bölgeye ulaşan kan akımının tamamen kesildiği ve 4 saati geçen sürelerde ipsilateral testiste geri dönüşümsüz hasar ve testis fonksiyonlarında kayıp meydana geldiği gösterilmiştir (8).

Kontralateral testisin tek taraflı testis torsiyonunda hasar gördüğü, karşıt görüşler olmakla beraber genel olarak kabul görmüştür (7). Torsiyonu takiben kontralateral testiste germinal epitelyumda apoptozun artması, atrofik Leydig hücreleri, spermatidlerde malformasyon ve Sertoli hücrelerinde patolojik değişiklikler gibi anormallikler gözlenir. İpsilateral testisteki torsiyonun kontralateral testisi nasıl etkilediği kesin olarak bilinmemekle beraber, bozulan kan-testis bariyerinin sonucu apoptozu uyaran faktörlerin ve otoimmün olayların bu süreçte önemli olduğu ifade edilmektedir (7,8). Son dönemlerde kontralateral testisteki hasarı açıklamada kullanılan bir başka teori de refleks vazokonstriksiyondur. Bu teoriye göre stres altındaki spermatik kord sempatetik aracılıkla kontralateral testiste spermatik damarların konstriksiyonunu uyarak iskemiye sebep olmaktadır (9).

Biz çalışmamızda 4 saatlik ve 720° torsiyonun ve NAC kullanımının ipsilateral ve kontralateral testislerdeki biyokimyasal ve histolojik etkilerini inceledik. Bu çalışmayla ilk kez uzun dönem testis dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri değerlendirildi. Yine çalışmamız NAC'ın uzun dönem testis torsiyonundaki etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve oksidatif doku hasarının hassas bir göstergesidir (21). Testisler yüksek lipid içeriğinden dolayı (özellikle 20:4 ve 22:6 doymamış yağ asitleri) oksidatif strese yatkın bir dokudur. Akut testis torsiyon çalışmalarının tamamına yakınında istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur (7,8,10). Çalışmamızda ipsilateral testisteki torsiyon grubunda MDA seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı seviyede düşük bulduk ($p=0.016$). Uzun dönem testis torsiyonu çalışmalarında MDA torsiyon gruplarında yüksek bulunmuştur (72,74). Ancak bu çalışmalarda torsiyon süresi bir saattir. Yukarıda bahsedildiği gibi torsiyon süresi doku hasarında oldukça önemli bir parametredir. İskemi grubunda sol testis atrofiye olmuştur. Histolojik incelemede iskemik testiste doku hasarı açıkça görülmektedir. Bu hasarın MDA seviyelerine yansımamasında atrofiye olmuş testisteki doku bileşimindeki değişikliklerin etkili olduğunu kanaatindeyiz. Yine NAC uygulanan grupta MDA seviyeleri daha düşük bulunmuştur. Her iki dokunun da atrofiye olduğu

göz önüne alınırsa kontrolden bağımsız olarak, NAC uygulaması MDA değerlerini düşürmüştür. Histolojik görüntülerde bu bulguyu desteklemektedir.

Sağ testisteki MDA değerlerinde gruplar arasında anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir. Turner ve arkadaşları bizim de kullandığımız torsiyon modelini kullanarak yaptıkları çalışmada kontralateral testiste iki ayın sonunda histolojik olarak herhangi bir değişiklik bulamamışlardır (8). Abraham ve arkadaşları tarafından bir saatlik torsiyonla gerçekleştirilen çalışmada sağ ve sol testislerde MDA yönünden fark bulunamamıştır (72).

Testisler metabolizmaları ve fonksiyonları gereği mitokondrilerinde veya ksantin oksidaz, NADPH oksidaz ve sitokrom P450 sistemleri ile sürekli olarak ROS üretmektedir. Bu moleküllerin dokuya hasar verme riskine karşı, testis dokusu enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan oldukça karışık bir antioksidan savunma sistemiyle donatılmıştır. Bu sistemin bir parçası olan SOD, O_2^- anyonunu H_2O_2 'e dönüştürür. Testis dokusunda klasik olarak bilinen sitozolik (Cu/Zn SOD) ve mitokondriyal (Fe/Mn SOD) SOD'un dışında, özellikle Sertoli hücreleri olmak üzere eşey hücrelerinden ekstrasellüler SOD (SOD-Ex)'da üretilmektedir (33,35). Çalışmamızda sol testiste iskemiye bağlı olarak SOD aktivitesini düşük bulmamıza rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.401$). Sağ testiste de gruplar arasında fark bulunamadı. Akut deneysel testis torsiyonu çalışmalarının çoğunda reperfüzyonu takiben SOD aktivitesinde azalma gözlenmiştir (7,10,76). Bu azalışın aşırı üretilen süperoksit anyonunun hızlıca H_2O_2 çevrilmesi ve bu molekülün SOD üzerindeki inhibitör etkisinin bir sonucu olabileceği ifade edilmiştir (19).

CAT hücre organellerinde özellikle mitokondri ve peroksizomlarda bulunan bir enzimdir ve H_2O_2 'nin suya dönüşümünü katalizler (14). Sitozolik aktivitesi eritrositler dışında oldukça düşüktür. Süperoksit anyonu tarafından aktivitesi inhibe edilir (55). Çalışmamızda sol testiste CAT aktivitesi detorsiyonu takiben iki ayın sonunda hem iskemi grubunda hem de NAC uygulanan grupta yüksek bulunmasına rağmen sadece NAC grubunda yükseliş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.016$). Sağ testisteki CAT aktivitesi yönünden herhangi bir farklılık gözlenmedi.

GPx, CAT gibi H₂O₂'yi suya indirgeyen sitozolik bir enzimdir. Mitokondri ve nükleer fraksiyonda da GPx aktivitesi bulunur. Aktif bölgesinde sistein rezidüsüne bağlı Se bulunur. Testislerde yapılan iskemi-reperfüzyon çalışmalarında reperfüzyon öncesi Se uygulaması lipid peroksidasyonunu azaltır ve histopatolojik profilde iyileşmeye sebep olur. GPx glutasyon bağımlıdır, normal fonksiyonu için indirgenmiş glutatyona ihtiyaç duyar (14,15). İpsilateral testiste oluşan H₂O₂' ye karşı en etkili antioksidan enzimdir. Bunda hücre içi lokalizasyonunun ve H₂O₂ ilgisinin CAT'dan fazla olması önemlidir. Ayrıca CAT'dan farklı olarak süperoksit anyonunun inhibisyonuna uğramaz (55). Yapılan akut deneysel torsiyon çalışmalarının çoğunda GPx aktivitesi reperfüzyon sonrası yüksek bulunmuştur (10,15). Çalışmamızda sol testiste gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Sağ testiste ise akut torsiyon çalışmalarına benzer şekilde GPx aktivitesi iskemi ve NAC grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0.008, p=0.016).

Glutasyon tiyol grubu içeren ve suda çözülebilen bir tripeptittir. Hemen hemen her hücre tipinde sentezlenmesine rağmen asıl sentez yeri karaciğerdir. Hücrelerde glutasyon serbest ve proteinlere bağlı olarak bulunur. Glutasyonun ana fonksiyonu hücrenel bileşenleri normal metabolizma sırasında oluşan hidroperoksitlerin hasarına karşı korumaktır. Hücrelerde glutasyonun büyük bir kısmı aktif formu olan indirgenmiş glutasyon (GSH) şeklinde bulunur. Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) miktarı azdır ve esas olarak aktif olan glutasyon redüktaz tarafından GSH'a çevrilir. Glutasyon redüktaz oksidatif stres tarafından indüklenen bir enzimdir (62). Testis torsiyonu çalışmalarında doku GSH miktarları düşük bulunmuştur (7,75). Çalışmamızda hem sol hem de sağ testiste GSH seviyeleri yönünden gruplar arasında bir farklılık bulunamamıştır. NAC uygulamasının reperfüzyondan sonra altı gün devam etmesi ve kalan iki ay boyunca uygulanmamış olması GSH miktarı üzerine NAC etkisinin olmamasına bağlanabilir.

Yukarıda bahsedilen sonuçlar doğrultusunda testis torsiyonunun uzun dönemde ipsilateral ve kontralateral testis üzerine etkilerini incelediğimiz çalışmada aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

Torsiyon gerçekleşen testisin literatür bilgilerine uyumlu olarak atrofiye olmuştur. Kontralateral testiste gözle görünen morfolojik bir değişiklik yoktur.

Antioksidan enzim aktiviteleri yönünden ipsilateral testiste CAT aktivitesinde ve kontralateral testiste GPx aktivitesi yüksek bulunmuştur. Diğer ölçülen parametreler yönünden bir farklılık bulunmamaktadır. Akut torsiyonda doku hasarını göstermekte doğrudan hücre kaynaklı olmalarından dolayı biyokimyasal parametrelerin, uzun dönem torsiyonda ise histopatolojik bulguların doku hasarının değerlendirilmesinde daha belirleyici olabileceği fikrindeyiz. Torsiyonu takip eden süreçte inflamatuvar sitokinlerin antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarında değişiklikler yapacağı muhakkaktır. Ancak iki aylık sürenin sonunda dokunun iyileşme döneminde antioksidan enzim aktiviteleri doku hasarını yansıtmamaktadır ve bu yönleriyle testis torsiyonunun uzun dönem etkilerinin araştırılmasında uygun parametreler olmayabilirler. Ancak, protein karbonil grubu ve 8-OH deoksiguanozin gibi daha uzun süre yüksek kalan oksidatif stres belirteçleri uzun dönem testis torsiyonuna bağlı doku hasarını göstermede daha etkili faktörler olabilir.

Birçok çalışmada etkili bir antioksidan olarak kullanılan NAC uygulamasının, çalışmamızda deney gruplarında herhangi bir etkinliği gözlenmemiştir. İki aylık süre içerisinde reperfüzyon öncesi de dahil olmak üzere sadece altı gün kullanılan bu bileşiğin uygulama süresindeki kısalık etkinliğinin ortaya konmasında sınırlayıcı bir faktör olabilir. Ancak bizim kullandığımız çalışma modelinde antioksidan enzimler üzerine bir etkisi bulunamamıştır.

8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. İpsilateral testis atrofiye olmuştur.
2. İpsilateral testisteki torsiyon grubunda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur.
3. İpsilateral testisteki CAT aktivitesi kontrol grubuna NAC grubunda yüksek bulunmuştur.
4. Kontralateral testiste GPx aktivitesi kontrol grubuna göre iskemi ve NAC gruplarında yüksek bulunmuştur.
5. Testis torsiyonunda uzun dönem doku hasarının değerlendirilmesinde biyokimyasal parametrelerden protein karbonil grubu ve 8-OH deoksiguanozin düzeyleri daha etkili parametreler olabilir.
6. Farklı torsiyon sürelerinde ve derecelerinde yapılabilecek uzun dönem çalışmalarla doku hasarının değerlendirilmesinde biyokimyasal parametrelerin etkinliği daha sağlıklı şekilde değerlendirilebilir.
7. Farklı torsiyon derece ve sürelerinin uygulandığı uzun dönem deneysel testis torsiyonu çalışmalarında, yapılacak GSSG ve GSH ölçümleri ile GSH/GSSG oranındaki değişiklikler bulunarak ipsilateral ve kontralateral testislerin maruz kaldığı oksidatif stresin şiddeti değerlendirilebilir.
8. Uzun dönem testis torsiyonu çalışmalarında NAC'ın daha uzun süre uygulanması ile doku hasarına karşı etkinliği daha net bir şekilde ortaya konulabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Saba M, Morales CR, Lamirande E, Gagnon C (1997). Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *J Urol* 157: 1149–1154.
2. Murphy JP (2003). The acute scrotum. *Operative pediatric surgery* (Ed: Ziegler MM, Azizkhan RG, Weber TR). New York, 563-68.
3. Granger DN, Korthuis RJ (1995). Physiological mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 57: 311.
4. Aktaş BK, Bulut Ş, Bulut S, Baykam MM, Ozden C, Senes M, Yücel D, Memiş A (2010). The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int* 26: 293-298.
5. Flora SD, Grassi C, Carati L (1997). Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment. *Eur Respir J* 10: 1535.
6. Kelly GS (1998). Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 3: 114-128.
7. Filho DW, Torres MA, Bordin ALB, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A (2004). Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspect Med* 25: 199.
8. Turner TT (1985). Acute Experimental Testicular Torsion. *J Androl* 6: 65-72.
9. Visser AJ, Heyns CF (2003). Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU Int* 92: 200-2003.
10. Cay A, Alver A, Kucuk M, Isik O, Eminagaoglu MS, Karahan SC, Deger O (2006). The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res* 131: 199–203.
11. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44 – 84.
12. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49: 481 – 493.

13. Ochsendorf FR, Thiele J, Fuchs J, Schuttau H, Freisleben HJ, Buslau M, Milbradt R (1994). Chemiluminescence in semen of infertile men. *Andrologia* 26: 289 – 293.
14. Nordberg J, Arner E (2001). Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology & Medicine* 31: 1287-1312.
15. Aitken RJ, Roman SD (2008). ,Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1: 15-24.
16. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY (2002). Antioxidant superoxide dismutase— A review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 65: 305 -311.
17. Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 216: 31 – 39.
18. Avlan D, Erdogan K, Cimen B (2005). The protective effect of selenium on ipsilateral and contralateral testes in testicular reperfusion injury. *Pediatr Surg Int* 21: 274-278.
19. Noeske HD, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W (1998). Historical milestones regarding torsion of the scrotal. *J Urol* 159: 13–16.
20. Abes M, Sarihan H, Değer O, Uydu HA (2001). The effect of ATP-MgCl₂ on prevention of reperfusion injury after unilateral testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg* 11: 255.
21. Başaklar AC (1994). Testis Torsiyonu: Yenidoğanın Cerrahi Hastalıkları. Ankara; 399-405.
22. Yurtçu M (2003). Testis Torsiyonundaki İskemi-Reperfüzyon Hasarını Önlemede Tek Doz ve Yedi Günlük Melatonin ve Steroid Tedavisinin Etkilerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Konya.
23. Caesar R, Kaplan G (1994). Incidence of the bell clapper deformity in an autopsy series. *Urology* 44: 108-120.
24. Cuckov PM, Frank JD (2000). Torsion of the testis. *BJU International* 86: 349-353.

25. Guiney EJ (1997). Emergency room problems. (Ed: O'Donnell B). Pediatric Urology. 3rd ed. Cambridge: The University Press, 281-285.
26. Hutson JM (1998). Undescended Testis Torsion and Varicocele. In O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG. editors. Pediatric Surgery Volume Two. 5th ed. London: Mosby-Year Book, 1099-1101.
27. Akgür FM, Kilinc K, Aktuğ T (1993). Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. Urol Res 21: 395-399.
28. Anderson MJ, Dunn JK, Lipschultz LI, Coburn M (1992). Semen quality and endocrine parameters after acute testicular torsion. J Urol 147: 1545-1550.
29. Sarica K, Küpeli B, Budak M, Kosar A, Kavukcu M, Durak L, Gogus O, (1997). Influence of experimental spermatic cord torsion on the contralateral testis in rats. Urol Int 58: 208-212.
30. Karakaya E (2006). Testis Torsiyonunun Detorsiyonu Sonrasında Oluşan İskemi/Reperfüzyon Hasarının Rosuvastatin ile Önlenilebilirliği. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
31. Şahin BÇ (2008). Ketaminin testiküler iskemi-reperfüzyon hasarındaki etkisi. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
32. Agarwal A, Prabakaran SA (2005). Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. Indian J Exp Biol 43: 963-974.
33. Melekos MD, Asbach HW, Markou SA (1988). Etiology of acute scrotum in 100 boys with regard to age distribution. J Urol 139: 1023-1025.
34. Kandilci HB, Gümüşel B (2005). Akciğerlerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve İskemik Önkoşullama. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 25: 35.
35. Ekin İ (2002). Çeşitli Antioksidanların Kobaylarda Oluşturulan Retinal İskemi-Reperfüzyon Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
36. Siemionow M, Arslan E (2004). Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. Microsurgery 24: 468-475.

37. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ (2005). Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 100: 179-190.
38. Flitter WD (1993). Free Radicals and Myocardial Reperfusion Injury. *Free Radical in Medicine*: 545-555.
39. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Sefalian AM (2004). Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 49: 1359-1377.
40. Şener G, Yeğen BÇ (2009). İskemi-Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 22: 5-13.
41. Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR (1993). Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. *Plast Reconstr Surg*: 92.
42. Villegas J, Schulz M, Soto L, Iglesias T, Miska W, Sanchez R (2005). Influence of reactive oxygen species produced by activated leukocytes at the level of apoptosis in mature human spermatozoa. *Fertil Steril* 83: 808 – 810.
43. Smith GR, Kaune GH, Parodi Ch D, Madariaga AM, Morales DI, Rios SR, Castro GA (2007). Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev Med Chil* 135: 279 – 286.
44. Ozkan KU, Boran C, Kilinc M, Garipardic M, Kurutas EB (2004). The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia–reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion detorsion. *J Ped Surg* 39: 91–95.
45. Akgür FM, Kilinc K, Aktug T (1995). Is ipsilateral testis mandatory for the occurrence of contralateral intratesticular biochemical changes indicative of hypoxia after unilateral spermatic cord torsion? *Eur Urol* 28: 143–148.
46. Kosar A, Sarica K, Kupeli B, Alcigir G, Kupeli S (1997). Testicular torsion: evaluation of contralateral testicular histology. *Int Urol Nephrol* 29: 351–356.
47. Carroll TA, Regan MC, Alyusuf R, Greene D, Curran B, Kay E, Leader M, Fitzpatrick JM (1997). Determination of testicular function after torsion by DNA flow cytometry of serial fine-needle aspirates. *Br J Urol* 79: 449–454.

48. Pedrosa RC, De Bem A, Locatelli C, Curi-Pedrosa R, Geremias R, Wilhelm FD (2001). Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep* 6: 265–270.
49. Blank ML, O'Neill PJ, Steigman CK, Cobb LM, Wilde RA, Havenstein PJ, Chaudry LH (1993). Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in prepubertal rats. *Urol Res* 21: 389–393.
50. Halliwell B (1999). Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept. *Nutrition Reviews* 57: 104-113.
51. Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya; 49.
52. Marklund SL (1984). Properties of extracellular superoksit dismutase from human lung. *Biochem J* 220: 269.
53. Helle RA, Jesper BN, Fleming N (1997). Antioxidative Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clin Chem* 43: 562-568.
54. Çimen Ç, Öter Ç, Demir H, Savran A (2005). Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi. *YYÜ Veteriner Fakültesi* 16: 15-20.
55. Kulikowska-Karpinska E, Moniuszko-Jakoniuk J (2003). The Antioxidative Barrier in the Organism. *Polish Environmental Studies* 13: 5-13.
56. Lardiniois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG (1996). Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1295: 222-238.
57. Pamukçu T, Sel T, Gül Y (2001). Blood serum concentrations of selenium and glutathione peroxidase activity in Akkaraman Sheep. *Turk J Vet Anim Sci* 25: 731-734.
58. Seven A, Candan G (1996). Antioxidant Defense Systems. *Cerrahpaşa J Med* 27: 41-50.
59. Flora SJ (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2: 191-206.

60. Dekhuijzen PN (2004). Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary diseases. *Eur Respir J* 23: 629-636.
61. Bartosz G (1993). Metabolizm glutation. *Post Biochem* 39: 32.
62. Armstrong D, Browne R (1994). The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol* 366: 43–58.
63. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271.
64. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
65. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/b5133?lang=en®ion=TR>
66. Aebi HE (1987). Catalase. In Bergmeyer HU, *Methods of Enzymatic Analysis* 3: 273-285.
67. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497.
68. Afzal M, Afzal A, Jones A, Armstrong D (2002). A Rapid Method for the Quantification of GSH and GSSG in Biological Samples. *Methods Mol Biol* 186: 117-122.
69. Power RE, Scanlon R, Kay EW, Creagh TA, Bouchier-Hayes DJ (2003). Long-term protective effects of hypothermia on reperfusion injury post-testicular torsion. *Scand J Urol Nephrol* 37 (6): 456-460.
70. Millea PJ (2003). N-Acetylcysteine: Multiple Clinical Applications. *Am Fam Physician* 80 (3): 265-269.
71. Cuzzocre S, Mazzon E, Castantino G, Serranio I, Sarro AD, Caputi AP (2000). Effects of N-acetylcysteine in rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 7: 537.
72. Abraham M, Kehinde EO, Anim JT, Mojiminiyi OA, Al-Awadi F, Shihab-Eldeen A, Omu AE, Fatinikun T, Prasad A (2005). Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU Int* 96: 175-180.

73. Turner TT, Prillaman HM (1997). Rescue of testicular function after spermatic cord torsion. *J Urol* 157: 340-345.
74. Al-Maghrebi B, Kehinde EO, Anim JT (2010). Long term testicular ischemia-reperfusion injury-induced apoptosis: involvement of survivin down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 395: 342-347.
75. Guimarães SB, Aragão AA, Santos JM, Kimura Ode S, Barbosa PH, Vasconcelos PR (2007). Oxidative stress induced by torsion of the spermatic cord in young rats. *Acta Cir Bras* 22: 30-33.
76. Payabvash S, Salmasi AH, Kiumehr S, Tavangar SM, Nourbakhsh B, Faghihi SH, Dehpour AR (2007). Salutary effects of N-acetylcysteine on apoptotic damage in a rat model of testicular torsion. *Urol Int* 79: 248-254.

10. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmanın Adı : "Deneysel Testis Torsiyonunda İMA Tanı Değeri ve İskemireperfüzyon Hasarı Üzerine Etil Pürüvatın ve N-Asetil Sisteminin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi" Çalışmacılar : Doç.Dr.S.Caner KARAHAN, Arş.Gör.Dr.Ahmet MENTEŞE, Y.Doç.Dr.Süleyman TÜREDİ, Doç.Dr.Esin YULUĞ, Y.Doç.Dr.Abdülkadir GÜNDÜZ, Y.Doç.Dr.Ömer KUTLU, Y.Doç.Dr.Ahmet ALVER, Uzm.Dr.Siha TÜRKMEN Anabilim Dalı : Biyokimya ABD.			
Etik Kurul Dosya No 2008/22	Etik Kurul Toplantı Tarihi 12.03.2009	Etik Kurul Toplantı No 2009/2	Etik Kurul Karar No 04
<p>Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında "Deneysel Testis Torsiyonunda İMA Tanı Değeri ve İskemireperfüzyon Hasarı Üzerine Etil Pürüvatın ve N-Asetil Sisteminin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi" başlıklı taşıyan çalışmanın, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul üyelerinin oybirliğiyle karar verilmiştir. (12.03.2009)</p> <p style="text-align: right;">Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı</p>			

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : BODUR, AKIN
Uyruğu : TC
Doğum tarihi ve yeri : 1985, ÜSKÜDAR
Medeni hali : BEKAR
Telefon : 05317167422
E-Posta : akinbodur28@gmail.com
Yazışma adresi : KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	2012
Lisans	ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ	2009
Lise	TEVFİK SERDAR ANADOLU LİSESİ	2003

YABANCI DİL

İNGİLİZCE

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusundaki Oksidan Antioksidan Dengenin Adipokin Salgılanması Üzerine Etkisi, TÜBİTAK Projesi, Bursiyer.

HOBİLER

Uzun mesafeli seyahatler, kitap okumak, internet, genel tarih, Galatasaray maçlarını takip etmek.